CU(I), CU(II) UND RS$^{\bullet}$ IN DER BIOCHEMIE DES SAUERSTOFFS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MAGED YOUNES
aus Kairo

1978

78 394

CU(I), CU(II) UND RS• IN DER BIOCHEMIE DES SAUERSTOFFS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der Eberhard-Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt von

MAGED YOUNES
aus Kairo

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.8.1978

Dekan : Prof. Dr. W. Zeil

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weser

2. Berichterstatter: Doz. Dr. A. Wendel

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Weser am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Weser danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche. Allen Mitarbeitern der Anorganischen Biochemie gebührt mein besonderer Dank. Die DFG hat durch Sachbeihilfen an Prof. Weser zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Edmund Lengfelder, München, und Herrn Dr. Christoph Richter, Zürich, möchte ich für ihre stete Unterstützung und Zusammenarbeit danken. Wertvolle Diskussionen lieferten Dr. W. Bors und Dr. M. Saran, Neuherberg bei München. Für ihre wertvolle technische Unterstützung bin ich den Damen M. Kurth und H. Woydeck, Tübingen, sowie C. Fuchs und C. Frenzel, München, zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst gebührt mein besonderer Dank für ein langjähriges Stipendium, das mir ermöglichte, mein Studium mit dieser Dissertation abzuschließen.

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Wenn man nur an sich denkt, kann man nicht glauben, daß man Irrtümer begeht, und kommt also nicht weiter. Darum muß man an jene denken, die nach einem weiterarbeiten. Nur so verhindert man, daß etwas fertig wird.

B. Brecht

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0056

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Reaktivität des Sauerstoffs im biochemischen Geschehen	1
1.2.	Angeregte Sauerstoffspezies	2
1.2.1.	Das Superoxidion	2
1.2.2.	Das Hydroxylradikal	3
1.2.3.	Singulett-Sauerstoff	4
1.2.4.	Übergänge zwischen den verschiedenen aktivierten Sauerstoffspezies	4
1.3.	Enzyme des Sauerstoffstoffwechsels	6
1.3.1.	Klassifikation von Sauerstoffenzymen im Stoffwechsel	6
1.3.2.	Die besondere Stellung der Cu-Proteine im Sauerstoffstoffwechsel	7
1.4.	Cupreine (Superoxiddismutase)	8
1.4.1.	Zur Katalyse der Superoxiddismutation	8
1.4.2.	Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität	9
1.4.3.	Pulsradiolyse	10
1.4.4.	Superoxiddismutase-Aktivität von Cu-Komplexen	11
1.4.5.	Anwendung von niedermolekularen, Superoxiddismutase-aktiven Cu-Komplexen	12
1.5.	Angeregte Sauerstoffspezies in biochemischen Reaktionen	13
1.6.	Zur Pathobiochemie der Inflammation	14
1.6.1.	Mögliche Beteiligung angeregter Sauerstoffspezies an inflammatorischen Prozessen	14
1.6.2.	Die antiinflammatorische Wirkung verschiedener Cu-Komplexe	15
1.7.	Blaue Kupferproteine als mögliche Reaktionspartner für angeregte Sauerstoffspezies im zellulären Geschehen	16
1.7.1.	Strukturmodelle für die blauen Kupferproteine	17
1.7.2.	Zur Struktur-Funktions-Korrelation	19
1.8.	Engere Problematik	21

		Seite
2.	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1.	Chemikalien	25
2.2.	Geräte	27
2.3.	Präparationen	28
2.3.1.	Isolierungen von biologischem Material	28
2.3.1.1.	Cuprein	28
2.3.1.2.	Plastocyanin aus Petersilie	28
2.3.1.3.	Reinigung kommerzieller Xanthinoxidase	29
2.3.1.4.	Mikrosomen	29
2.3.2.	Synthese von Kupferkomplexen	30
2.3.2.1.	Cu-Aminosäure-Komplexe	30
2.3.2.2.	Cu-Salicylate	30
2.3.2.3.	Cu-Penicillamin	30
2.3.2.4.	Strukturmodelle der blauen Cu-Proteine	31
2.3.2.5.	Andere Komplexe	31
2.4.	Analytik	32
2.4.1.	Elementaranalyse	32
2.4.2.	Spektroskopie	32
2.4.2.1.	Vis/UV-Spektrometrie	32
2.4.2.2.	Circulardichroismus	32
2.4.2.3.	Röntgenphotoelektronenspektrometrie	33
2.4.3.	Bestimmung von O_2 und H_2O_2	33
2.5.	Funktionelle Untersuchungen	34
2.5.1.	Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität	34
2.5.1.1.	Nitrotetrazoliumblau-Reduktion	34
2.5.1.2.	Adrenalinoxidation	35
2.5.1.3.	Cytochrom c-Reduktion	35
2.5.1.4.	Hydroxylamin-Test	36
2.5.1.5.	Dihydroxyfumaratautoxidation	36
2.5.2.	Nichtenzymatische Erzeugung von Sauerstoffradikalen	37
2.5.2.1.	Pulsradiolyse	37
2.5.2.2.	Kinetische Auswertung der Pulsradiolyseergebnisse	37

Seite

2.5.2.3. Röntgenradiolyse 38
2.5.3. Beteiligung von aktiviertem Sauerstoff an weiteren enzymatischen Reaktionen 38
2.5.3.1. Mikrosomale Dealkylierungs- und Hydroxylierungsreaktionen 38
2.5.3.2. Prostaglandin-Synthetase 39
2.5.3.3. Monoaminoxidase 40
2.5.3.4. Diaminoxidase 40

3. ERGEBNISSE 41
3.1. Produktanalyse der spontanen und katalytisch-beschleunigten Superoxiddismutation 41
3.2. Zur Spezifität indirekter Bestimmungen der Superoxiddismutase-Aktivität 43
3.2.1. Nitrotetrazoliumblau-Reduktion 43
3.2.2. Adrenalinoxidation 45
3.2.3. Hydroxylaminoxidation 50
3.2.4. Dihydroxyfumaratautoxidation 52
3.3. Eisen- und Mangankomplexe bei der Dismutation von $^{\cdot}O_2^-$ 54
3.4. Reaktive Sauerstoffspezies und Inflammation 55
3.4.1. Reaktivität von Kupfer-Salicylaten 55
3.4.1.1. Strukturelles 55
3.4.1.2. Indirekter Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität 57
3.4.1.3. Reaktion mit pulsradiolytisch erzeugten Superoxidradikalanionen 62
3.4.2. Das Penicillamin-Kupfer-Cluster 66
3.4.2.1. Superoxiddismutase-Aktivität von Cu-Penicillamin 67
3.4.2.2. Pulsradiolyse 69
3.4.2.3. Reaktivität der Inhibitoren ÄDTA und KCN 70
3.4.2.4. Strukturelle Untersuchungen 71

Seite

3.4.3. Zur SOD-Aktivität antiinflammatorischer Goldkomplexe 75

3.4.4. Superoxiddismutase-aktive Cu-Salicylate als $^{\cdot}O_2^-$-Indikatoren während mikrosomalen Hydroxylierungen 77

3.4.5. Hemmung des Prostaglandin-Synthetase-Komplexes in vitro durch die SOD-aktiven, antiinflammatorisch wirksamen Cu-Komplexe 79

3.4.6. Oxidativer Abbau der Hyaluronsäure als Modell für die Zerstörung der Synovialflüssigkeit bei inflammatorischer Arthritis 82

3.4.6.1. Enzymatische und chemische Systeme 83

3.4.6.2. Röntgenradiolytisch erzeugte Sauerstoffradikale 84

3.4.6.3. Weitere Versuche zum Nachweis der Entstehung von $^{\cdot}OH$-Radikalen aus $^{\cdot}O_2^-$ 87

3.5. Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an weiteren enzymatischen Reaktionen 88

3.5.1. Die Diaminoxidase-Reaktion 89

3.5.2. Die Monoaminoxidase-Reaktion 92

3.6. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von Modellkomplexen der blauen Kupferproteine 92

3.6.1. Strukturelle Untersuchungen von Plastocyanin und Cu-Modellchelaten 93

3.6.1.1. Röntgenphotoelektronenspektrometrie 94

3.6.1.2. Circulardichroismus 105

3.6.2. Zur Reaktion des Plastocyanins mit Superoxid 107

3.6.3. Reaktion des Superoxidradikals mit den Modellverbindungen 108

4. DISKUSSION 111

4.1. Substratspezifität der Superoxiddismutase 111

4.2. Die mögliche Rolle energiereicher Sauerstoffspezies bei inflammatorischen Reaktionen 113

		Seite
4.3.	Beteiligung von $^{\bullet}O_2^-$ an weiteren enzymatischen Reaktionen	116
4.4.	Energiereiche Sauerstoffspezies in der Biochemie	119
4.5.	Die Bedeutung der Struktur-Funktions-Korrelation	120
5.	ZUSAMMENFASSUNG	124
6.	LITERATURVERZEICHNIS	127

Abkürzungen

ÄDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
CD	Circulardichroismus
$Cu(Lys)_2$	$Cu(Lysin)_2$
$Cu(Tyr)_2$	$Cu(Tyrosin)_2$
DABCO	Diazabicyclo- 2,2,2 -oktan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Erythrocuprein
EPR	"Electron Paramagnetic Resonance"
ESCA	"Electron Spectroscopy for Chemical Analysis"
NAD	Nikotinamiddinucleotid
NMR	"Nuclear Magnetic Resonance"
PG	Prostaglandin
SOD	Superoxiddismutase
XPS	Röntgenphotoelektronenspektrometrie

1. EINLEITUNG

1.1. Reaktivität des Sauerstoffs im biochemischen Geschehen

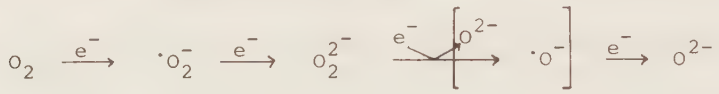
Sauerstoff spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel (1, 2). Er wird dabei entweder direkt in ein organisches Molekül eingebaut oder dient als Akzeptor für Elektronen, die beim oxidativen Abbau verschiedener Substrate frei werden. Jedoch zeigt der Sauerstoff auch toxische Wirkungen. Bei einem Sauerstoffdruck von über 1 atm wird die Atmung von Gewebeschnitten unterdrückt. Außerdem werden der Kohlenhydrat- und der Lipidstoffwechsel inhibiert, SH-Gruppen oxidiert und die Permeabilität vieler Metaboliten beeinträchtigt (3). Eine bakteriostatische Wirkung wird ferner dem Sauerstoff zugeschrieben (4).

Im Grundzustand liegt der Sauerstoff als stabiles paramagnetisches Biradikal, d.h. als Triplett ($^3\Sigma_g^-$), vor (5). Diese Tatsache ist eine der Ursachen für die Reaktionsträgheit dieses Moleküls, zumal dessen Reaktionspartner im Singulett-Grundzustand existieren. Eine direkte Reaktion zwischen einem Triplett und einem Singulett ist spinverboten, da die Spin-Inversion wesentlich langsamer abläuft als eine chemische Reaktion. Die zweite Ursache für die Reaktionsträgheit des Sauerstoffs ist, daß die Aufnahme des ersten Elektrons ($O_2 \xrightarrow{e^-} \cdot O_2^-$) ein endergonischer Vorgang ist (E_o = -0,32 V) (6).

Um eine chemische Reaktion eingehen zu können, muß das Sauerstoffmolekül also "aktiviert" werden, sei es durch Reduktion, durch Bindung an ein Metallion oder aber durch Überführung in eines der beiden energiereichen Singulettzustände (s.u.). Auch die toxischen Effekte des Sauerstoffs, v.a. die Lipidperoxidation, werden auf solche energiereiche Sauerstoffspezies, z.B. H_2O_2 (7,8), $\cdot O_2^-$-Radikale, $\cdot$OH-Radikale oder Singulett-Sauerstoff (4,9) zurückgeführt.

1.2. Angeregte Sauerstoffspezies

Während der Reduktion des Sauerstoffs, bei der ein Molekül 4 Elektronen aufnehmen kann, können verschiedene energiereiche Sauerstoffspezies auftreten:



Am reaktivsten und daher am instabilsten ist $^{\cdot}O^{-}$ bzw. dessen protonierte Form, das Hydroxylradikal ($^{\cdot}OH$).

1.2.1. Das Superoxidion

Das Superoxidion wird durch Aufnahme eines Elektrons durch eines der degenerierten $2p\pi g$ Orbitale des molekularen Sauerstoffs gebildet. Durch die unregelmäßige Besetzung dieser Orbitale kommt es zu einer Jahn-Teller Verzerrung, die zur Aufspaltung dieser Orbitale führt (10). Als paramagnetisches Ion zeigt das Superoxidradikal ein charakteristisches EPR-Spektrum ($g_{\perp} = 2{,}007$; $g_{\parallel} = 2{,}087$) (11), das auch theoretisch untersucht worden ist (12). Ferner zeigt $^{\cdot}O_2^{-}$ ein charakteristisches Absorptionsspektrum, das auf den $2p\sigma g \rightarrow 2p\pi g$ -Übergang zurückzuführen ist (13,14). Beide Eigenschaften werden zum direkten Nachweis der Superoxidradikale herangezogen (11,15,16). Alternativ wird die Entstehung von $^{\cdot}O_2^{-}$ indirekt durch Folgereaktionen nachgewiesen, z.B. die Reduktion von Cytochrom c (17), modifiziertem Cytochrom c (18), Tetranitromethan (19), Nitrotetrazoliumblau (20,21) oder die Oxidation von Adrenalin (19), Sulfit (22), Hydroxylamin (23) und Katecholen (24).

Superoxid kann enzymatisch erzeugt werden. Am häufigsten wird Xanthinoxidase in Verbindung mit ihren Substraten Xanthin, Hypoxanthin oder Acetaldehyd verwendet (25). Die bequemste Quelle für $^{\cdot}O_2^{-}$ ist Kaliumsuperoxid, KO_2, das in

Dimethylsulfoxid sehr schwach löslich ist. In Gegenwart von Dicyclohexyl-18-crown-6 konnte jedoch eine 0,15 M Lösung von KO_2 in DMSO hergestellt werden (26). Superoxidradikale entstehen ferner durch die Oxidation von H_2O_2 mittels Ce(IV)-Ionen (27), durch die Einwirkung von Metallionen auf O_2 (28) und durch die chemische Umsetzung von Riboflavin mit Sauerstoff und NADH (29). Die kathodische Reduktion von O_2 in aprotischen Lösungsmitteln ist ebenfalls eine bequeme Methode zur Superoxiderzeugung (15,19,30,31); in Wasser entsteht bei der Elektrolyse auch zunächst Superoxid, das aber sofort disproportioniert (32). Ferner läßt sich $^{\cdot}O_2^-$ durch Ultraschall (33) oder durch die Reaktion von Sauerstoff mit Chinonen (34) und Tetrahydropteridinderivaten (35) darstellen. Superoxidradikale können in hohen Konzentrationen durch Puslradiolyse (36,37) oder Blitzlichtphotolyse (38) erzeugt werden. Eine Übersicht über die Chemie des Superoxidradikals ist in (39) gegeben.

1.2.2. Das Hydroxylradikal

Das Hydroxylradikal ist eine sehr reaktive Spezies mit großem Energiegehalt. Der direkte Nachweis dieses Radikals fällt schwer. Man ist oft auf indirekte Hinweise auf die Beteiligung von $^{\cdot}OH$-Radikalen an bestimmten Reaktionen angewiesen, und zwar wenn diese durch Hydroxylradikalfänger wie Formiat, Benzoat, t-Butanol, Mannit, Äthanol oder Dimethoxyäthan gehemmt werden (40-44). Ferner soll die Äthylenbildung aus ß-Methyl-thiopropionaldehyd (Methional) die Gegenwart von $^{\cdot}OH$ anzeigen (45).

Hydroxylradikale entstehen bei der Reaktion von Fe^{2+} mit H_2O_2 (Fentons Reagens), sowie durch Pulsradiolyse (46) oder Photolyse des Wassers (47).

1.2.3. Singulett-Sauerstoff

Singulett-Sauerstoff kommt in zwei Formen vor: $^1\Sigma_g^+$ und $^1\Delta_g$, wobei letztere längerlebig ist. Die Lebensdauer von $^1\Delta_g O_2$ beträgt 2 µs in H_2O, 20 µs in ^2H_2O, 30 µs in Acetonitril und 700 µ s in CCl_4 (48-50). Zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff dient die Chemilumineszenz, die durch $^1O_2$-Paare verursacht wird (51,52), sowie die Fluoreszenzanregung von Rubren (53) und anderen Substanzen (52). Außerdem dienen Reaktionen mit Abfangreagenzien zum Nachweis von $^1O_2$. Diese können inert sein, wie zum Beispiel β-Karotin (54) oder aber reaktiv, wie Diphenylisobenzofuran (48) oder einige Dialkylsulfide (55).

Singulett-Sauerstoff entsteht bei dem thermischen Zerfall der Ozonaddukte von Arylphosphiten (56-59) sowie bei der Reaktion von H_2O_2 mit Hypochlorit (60,61). Die gängigste Methode zur Herstellung von $^1O_2$ ist die photochemische Anregung des Sauerstoffs mit Hilfe von sogenannten "Sensitizer"-Molekülen, vor allem Methylenblau (62-67).

1.2.4. Übergänge zwischen den verschiedenen aktivierten Sauerstoffspezies

Schon 1934 postulierten Haber und Weiß auf Grund ihrer Arbeiten über die Reaktion von Peroxiden mit Fe^{2+}, daß die angeregten Sauerstoffspezies ineinander übergehen können (68):

$$\cdot O_2^- + H_2O_2 + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O + \cdot OH$$

$$\cdot OH + H_2O_2 \rightarrow H_2O + \cdot O_2^- + H^+$$

$$\cdot O_2^- + \cdot OH \rightarrow OH^- + {}^1O_2$$

Ferner postulierte Khan, daß bei der spontanen Disproportionierung von Superoxid Singulett-Sauerstoff entsteht (69).

Die Fähigkeit des Superoxidradikals, Hydroxylierungsreaktionen einzugehen (70),wurde für dessen Rolle bei der Inaktivierung von DNA (71), bei der Lipidperoxidation (72), bei inflammatorischen Prozessen (73) und bei der Radiotherapie (74) verantwortlich gemacht. Czapski konnte jedoch zeigen, daß $^{\cdot}O_2^-$ zwar an Elektronentransfer-Reaktionen teilnehmen, nicht aber direkt mit organischen Molekülen reagieren kann (13). Dies führte zu der Theorie, daß $^{\cdot}OH$-Radikale, die durch die Reaktion von $^{\cdot}O_2^-$ mit H_2O_2 entstehen könnten, für diese Hydroxylierungsreaktionen verantwortlich sind (75).

Mehrere Autoren versuchten, diese Reaktion experimentell indirekt nachzuweisen (76-78), jedoch blieben sie alle einen eindeutigen Beweis schuldig. Aus kinetischen Gründen wäre diese Reaktion gegenüber der viel schnelleren spontanen Dismutation von Superoxid zu vernachlässigen. Thermodynamisch hingegen ist diese Reaktion möglich (79). Eine Möglichkeit wäre, daß die Reaktion von Superoxid mit Peroxid, die zur Bildung von Hydroxylradikalen führt, erst durch Metallkatalyse stattfinden kann; dies konnte kürzlich gezeigt werden (80).

Die Entstehung von $^1\Delta_gO_2$ bei der spontanen Disproportionierung von Superoxid (69) konnte ebenfalls nicht bewiesen werden. Obwohl aus thermodynamischen Erwägungen eine solche Reaktion durchaus denkbar wäre (79,81), waren die Versuche, diese Reaktion experimentell nachzuweisen, von schwacher Aussagekraft (76,82) oder sie lieferten negative Ergebnisse (83). Dies könnte daran liegen, daß $^1\Delta_gO_2$ durch eine schnelle Reaktion mit $^{\cdot}O_2^-$ direkt abgefangen wird (84).

1.3. Enzyme des Sauerstoffstoffwechsels

1.3.1. Klassifikation von Sauerstoffenzymen im Stoffwechsel

Die meisten Enzyme, die am Metabolismus des Sauerstoffs beteiligt sind, sind Metalloenzyme, die meist Eisen oder Kupfer enthalten. Für viele dieser Reaktionen sind auch Modellsysteme entwickelt worden (2). Man kann die enzymatisch katalysierten Sauerstoffreaktionen je nach Reaktionstyp wie folgt einteilen:

Reaktionstyp	Reaktion	Beispiele für beteiligte Enzyme
$O_2+E\text{-}M \rightleftharpoons E\text{-}M\text{-}O_2$	Reversible Oxygenierung	Hämoglobin, Myoglobin
$O_2+E\text{-}M_2 \rightleftharpoons E\text{-}M_2\text{-}O_2$	Reversible Oxygenierung	Hämerythrin, Hämocyanin
$2\,{}^{\cdot}O_2^- \rightleftharpoons O_2+O_2^{2-}$	Superoxiddismutation	Cupreine, Fe- und Mn-Superoxiddismutasen
$O_2^{2-}+O_2^{2-} \overset{4H^+}{\rightleftharpoons} O_2+2H_2O$	Peroxid-Dis-Proportionierung	Katalase
$2O_2^{2-}+A_{red} \overset{4H^+}{\rightleftharpoons} A_{ox}+2H_2O$	Peroxidation	Peroxidasen
$O_2+SH \rightarrow SHO_2$	Dioxygenase-Reaktion	Tryptophan Dioxygenase, Indolamin Dioxygenase
$O_2+SH+AH_2 \rightarrow SOH+H_2O+A$	Monooxygenase-Reaktion	Tyrosinase, Cyt.-P450-abhängige Monooxygenasen
SH → Dehydrogenierung ↠ O_2 (↠H_2O_2 oder H_2O)	Oxidase-Reaktion	Cytochrom-c Oxidase, Laccase, Askorbatoxidase

1.3.2. Die besondere Stellung der Cu-Proteine im Sauerstoffstoffwechsel

Neben Eisen spielt Kupfer eine zentrale Rolle im Stoffwechsel des Sauerstoffs. Beispiele wären das Hämocyanin, das bei der reversiblen Oxygenierung eine Rolle spielt, die Cupreine, die an der Katalyse der spontanen Dismutation von Superoxid beteiligt sind, die kupferhaltigen Oxidasen, die am Peroxidmetabolismus teilnehmen, die "blauen" Oxidasen, die zur Bildung von H_2O führen, und die diversen Oxygenasen (85).

Bei den kupferhaltigen Proteinen und Enzymen unterscheidet man zwischen drei Arten von Cu-Zentren: Typ 1 oder "blaue" Kupferzentren, Typ 2 oder "nicht-blaue" Kupferzentren und Typ 3 oder "EPR-inaktive" Kupferzentren (86). Typ 1 Cu zeigt eine charakteristische Absorptionsbande bei 600 nm, die einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten aufweist (87). Die EPR-Parameter sind insofern einzigartig, als sehr niedrige g-Werte und eine sehr kleine Hyperfeinaufspaltung gemessen werden. Typ 2 Kupfer kommt vor in vielen Multi-Cu-Oxidasen. Sowohl die Absorptions- als auch die EPR-Parameter sind mit denen einfacher Cu(II)-Komplexe vergleichbar. Anionische Inhibitoren, wie Cyanid oder Azid, werden ziemlich fest gebunden. Typ 3 Cu ist in der Hauptsache EPR-inaktiv. Dabei könnte es sich um Cu(I), Cu(I)-Cu(III)-Paare oder antiferromagnetisch gekoppelte Cu(II)-Paare handeln.

Allen Spezies von proteingebundenem Kupfer ist gemein, daß sie letzten Endes einen Elektronentransfer zum Sauerstoff ermöglichen, auch wenn diese Funktion in vielen Varianten erfüllt wird (88).

1.4. Cupreine (Superoxiddismutase)

1939 konnten Mann und Keilin ein grünes Cu,Zn-Protein isolieren, das Erythrocuprein (89). Dieses kupferhaltige Protein wurde in den darauffolgenden Jahren strukturell und funktionell gut untersucht (s.u.), was sich in den vielen Übersichtsartikeln widerspiegelt (90-94). Es handelt sich um ein dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 32000. Die Monomere enthalten je 1 g-Atom Zn und Cu pro Mol. Aus NMR-Daten konnte auf die Beteiligung von vier bis sechs Histidinresten an der Koordinationssphäre der Metalle geschlossen werden (95,96). Die Kinetik der Dissoziation zu Protomeren wurde kürzlich untersucht; dabei zeigte sich aus EPR-Daten, daß die Kupfersphäre im Protomeren auch eine aktive Konfiguration einnehmen kann (97).

Als erstes Kupferprotein konnte die Röntgenstrukturanalyse des Erythrocupreins erfolgreich durchgeführt werden (98,99). Das aktive Zentrum zeigt einzigartige Struktureigenschaften insofern, als ein Histidinrest (His-61) als Brücke sowohl dem Zink als auch dem Kupfer als Liganden dient.

1.4.1. Zur Katalyse der Superoxiddismutation

McCord und Fridovich konnten 1969 zeigen, daß das Erythrocuprein in der Lage ist, die spontane Disproportionierung ("Dismutation") von Superoxid zu Sauerstoff und Peroxid zu beschleunigen (19):

$$\cdot O_2^- + \cdot O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Kurz darauf konnten mehrere "Superoxiddismutasen", die auch andere Metalle, und zwar Eisen und Mangan, enthielten, isoliert werden (100-102). Die Theorie jedoch, daß diese Enzyme nur in aeroben Organismen vorkommen (103), konnte nicht gehalten werden: Superoxiddismutase-Aktivität konn-

te in mehreren obligaten Anaeroben nachgewiesen werden (104) und eine eisenhaltige Superoxiddismutase sogar aus dem strikten anaeroben Desulfovibrio desulfuricans isoliert werden (105).

Mehrere Beobachtungen deuten jedoch darauf hin, daß dieses Enzym eine zentrale Rolle im Sauerstoffstoffwechsel spielt. Das Metalloenzym läßt sich durch Sauerstoff induzieren (106). Es schützt ferner die roten Blutkörperchen vor der peroxidativen Hämolyse (107) und verhindert die Peroxidation der inneren Mitochondrienmembran (72). Lavelle et al. fanden, daß Superoxiddismutasen verschiedene biologische Systeme vor Strahlenschäden schützen (108). Intravenöse Injektion von SOD konnte die Schäden von Röntgenstrahlen bei Mäusen vermindern (109,110). Ferner konnte die metallkatalysierte Peroxidation von Phospholipiden von Gehirnmembranen durch natives Cuprein verhindert werden (111), ebenfalls die Zerstörung von Modellmembranen durch Röntgen- oder ^{137}Cs-γ-Strahlen (112). Dies alles deutet darauf hin, daß diese Enzymgruppe nicht nur die spontane Disproportionierung von Superoxidionen beschleunigt.

1.4.2. Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität

Die meisten Testsysteme für die Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität sind von indirekter Natur. Sie beruhen auf der Fähigkeit der Superoxiddismutasen, Reaktionen, die auf die Oxidations- bzw. die Reduktionseigenschaften von Superoxid beruhen, zu inhibieren. Die Quellen der Sauerstoffradikale sind enzymatischer, chemischer oder elektrochemischer Natur. Die gängigsten Indikatorreaktionen sind die Reduktion von Cytochrom c (17) und Nitrotetrazoliumblau (20,21) sowie die Oxidation von Adrenalin (19) und Hydroxylamin (23). Ein sogenannter "positiver" Test beruht auf der Aufhebung der Hemmung der Photooxidation von

Dianisidin durch $^{\cdot}O_2^-$ (113,114). Eine weitere Bestimmungsmethode basiert auf der polarographischen Messung der Sauerstoffreduktion (115,116). Ferner wurde eine Methode zur direkten Beobachtung von Superoxid beschrieben, die jedoch sehr unempfindlich ist (117). Die klarste und aussagekräftigste Methode zur Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität ist die Pulsradiolyse.

1.4.3. Pulsradiolyse

Mit Hilfe der Pulsradiolyse (118) lassen sich hohe Konzentrationen an Primär- und Sekundärradikalen erzeugen. Je nach Zusammensetzung der bestrahlten Lösung und je nach Art der Begasung lassen sich spezifisch bestimmte Radikale herstellen. In sauerstoffbegaster, formiathaltiger wässriger Lösung erhält man fast ausschließlich $^{\cdot}O_2^-$ (119):

$$H_2O \xrightarrow{\sim\sim} e^-_{aq},\ {}^{\cdot}H,\ {}^{\cdot}OH,\ H_2,\ H_2O_2,\ H_3O^+,\ OH^-$$

$$e^-_{aq} + O_2 \longrightarrow {}^{\cdot}O_2^- \qquad k = 2 \cdot 10^{10}\ M^{-1}s^{-1}$$

$$^{\cdot}H + O_2 \longrightarrow HO_2^{\cdot} \qquad k = 2 \cdot 10^{10}\ M^{-1}s^{-1}$$

$$^{\cdot}OH + HCOO^- \longrightarrow H_2O + {}^{\cdot}COO^- \qquad k = 2 \cdot 10^{9}\ M^{-1}s^{-1}$$

$$^{\cdot}H + HCOO^- \longrightarrow H_2 + {}^{\cdot}COO^- \qquad k = 5 \cdot 10^{8}\ M^{-1}s^{-1}$$

$$^{\cdot}COO^- + O_2 \longrightarrow CO_2 + {}^{\cdot}O_2^-$$

$$HO_2^{\cdot} \longrightarrow H^+ + {}^{\cdot}O_2^- \qquad pK = 4{,}8$$

Der Zerfall von Superoxid kann mit Hilfe spektroskopischer Methoden verfolgt und die Kinetik dieses Zerfalls dann berechnet werden. Für die spontane Dismutation von Superoxidradikalen wurde eine Reaktionskonstante zweiter Ordnung

von $8 \cdot 10^7$ $M^{-1}s^{-1}$ bei physiologischem pH bestimmt (120).

Mit Hilfe dieser Methode konnte man für die durch 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase katalysierte Reaktion eine Konstante zweiter Ordnung zwischen 1,6 und $2,6 \cdot 10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ bestimmen (121-124). Durch Kombination dieser Methode mit der "rapid-freeze"-Technik und EPR-Messungen konnte auch ein Reaktionsmechanismus postuliert werden (125). Pulsradiolytische Untersuchungen ergaben ferner Hinweise, daß der gemeinsame Histidin-Ligand von Cu und Zn am katalytischen Mechanismus des Enzyms direkt beteiligt ist (126). Für das Mn-Enzym wurde eine Reaktionskonstante von $1,5 \cdot 10^9$ $M^{-1}s^{-1}$ (127), für das Fe-Enzym jedoch eine Konstante, die relativ niedrig liegt, u.z. bei $5,5 \cdot 10^8$ $M^{-1}s^{-1}$ (128), gefunden.

1.4.4. Superoxiddismutase-Aktivität von Cu-Komplexen

Mit Hilfe vom Cytochrom c- und vom Chemilumineszenz-Test der Superoxiddismutase-Aktivität konnte ermittelt werden, daß mehrere niedermolekulare Cu-Aminosäure- und Cu-Peptidkomplexe eine hohe Aktivität als Katalysatoren der spontanen Dismutation von Superoxid aufweisen. Aktivitäten bis zu 7,5 % von der des nativen Cupreins konnten ermittelt werden. Am aktivsten waren die Kupferkomplexe von Tyrosin, Lysin und Histidin, sowie von einigen derer Di- und Tripeptide (129,130). Brigelius et al. konnten darüber hinaus zeigen, daß die Reaktionskonstante zweiter Ordnung für diese Cu-Chelate genauso hoch waren wie die des nativen Enzyms. Reines $CuSO_4$ war sogar eine noch aktivere Superoxiddismutase als das native Cuprein selbst (131-133). Dieser Befund war sehr erstaunlich. Zwar sind Modellkomplexe, die eine enzymatische Reaktion nachahmen, keine Seltenheit, so zum Beispiel der Oxidase-aktive Cu(II)-Poly-L-Histidinkomplex (134) oder die katalytisch aktiven Metallkomplexe (135-137). Jedoch liegen hier die Konzen-

trationen, die benötigt werden, um eine Katalyse zu bewirken, die der enzymatischen gleicht, um 2-4 Zehnerpotenzen höher als die benötigte Enzymkonzentration.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß Fe-Porphyrin-Systeme (138), Mn-haltige Partikel aus Chloroplastenmembranen (139) und Eisen-ÄDTA-Komplexe (140) ebenfalls superoxiddismutatisch wirksam sein können. Eine pulsradiolytische Untersuchung der Katalyse durch Fe-ÄDTA ergab Konstanten zweiter Ordnung für die Reaktion mit $^{\cdot}O_2^-$ um $5 \cdot 10^7$ $M^{-1}s^{-1}$ (141).

All diese Befunde deuteten darauf hin, daß die Katalyse der spontanen Disproportionierung des Superoxidions nicht die alleinige Funktion der Cupreine sein kann. Finazzi-Agrò et al. schlugen eine direkte Reaktion mit Singulett-Sauerstoff vor (142). Es konnte gezeigt werden, daß die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch natives Cuprein, nicht aber durch die SOD-aktiven Cu-Komplexe verhindert werden kann, in jedem Fall, ob das $^1\Delta_g O_2$ enzymatisch (143), in einem rein anorganischen System (144,145) oder aber photochemisch (83,145,146) produziert wurde. Das Superoxid ist daher höchstwahrscheinlich nicht das einzige Substrat der Cupreine.

1.4.5. Anwendung von niedermolekularen, Superoxiddismutase-aktiven Cu-Komplexen

Da die Cu(II)-Aminosäurekomplexe, so $Cu(Tyr)_2$ und $Cu(Lys)_2$, die gleiche SOD-Aktivität wie natives Cuprein aufweisen, sollten sie die Reaktionen, die durch native 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase gehemmt werden, genauso gut unterbinden. Die unterschiedliche Aktivität der Cu-Komplexe auf der einen und des Cupreins auf der anderen Seite im Nitrotetrazoliumblau-Test in Gegenwart von enzymatisch produziertem $^{\cdot}O_2^-$ konnte dahingehend interpretiert werden, daß diese Be-

stimmungsmethode nicht spezifisch für Superoxid ist, zumal die Aktivität der niedermolekularen Komplexe wesentlich ansteigt, wenn das rein anorganische KO_2 als Reduktionsmittel verwendet wird (21).

Ein anderes Anwendungsgebiet wäre die Möglichkeit, die Beteiligung von Superoxid an bestimmten enzymatisch katalysierten Reaktionen zu demonstrieren, vor allem dann, wenn diese Radikale in der Nähe des aktiven Zentrums produziert werden, an das natives Cuprein wegen seiner molekularen Dimensionen und Polarität nicht herankommt. So konnten Cytochrom P-450 abhängige mikrosomale Dealkylierungs- und Hydroxylierungsreaktionen durch $Cu(Tyr)_2$ gehemmt werden, während Cuprein und das polare $Cu(Lys)_2$ keinen Einfluß zeigten (147-150). Diese Ergebnisse werden durch den Befund bestärkt, daß Cytochrom P-450 $\cdot O_2^-$-Radikale produziert (151).

1.5. Angeregte Sauerstoffspezies in biochemischen Reaktionen

Das Auftreten von Superoxidradikalen im Verlauf verschiedener biochemischer Reaktionen wurde oft mit Hilfe von indirekten Methoden, selten aber direkt (z.B. durch Messung des charakteristischen EPR-Signals) nachgewiesen. Beispiele für solche Reaktionen sind in (70,83) zusammengefaßt. Meistens geht man dabei von einer Reaktion des Superoxidions aus, die parallel zur untersuchten Umsetzung verläuft und die sich durch Cuprein hemmen läßt. Beispiele wären eine Ko-Oxidation von Adrenalin oder eine Ko-Reduktion von Nitrotetrazoliumblau oder Cytochrom c. Dabei wird außer acht gelassen, daß diese Reaktionen nicht spezifisch für $\cdot O_2^-$ sind. Solche Schlüsse sollten nicht gezogen werden, bis die Substratspezifität der Cupreine gesichert ist.

Daß $^{\cdot}O_2^-$ am katalytischen Vorgang beteiligt ist, konnte nur in den seltensten Fällen gezeigt werden. Die Cytochrom P-450 abhängigen Reaktionen sind ein Beispiel dafür (147-150). Weitere Beispiele sind die Indolamin-2,3-Dioxygenase (152, 153) und die Dopamin-β-Hydroxylase (154).

Auch die Beteiligung von $^{\cdot}OH$-Radikalen und $^1O_2$ an biochemischen Reaktionen kann nur indirekt angedeutet werden. So ist die Beteiligung von $^1\Delta_g O_2$ an der Lipidperoxidation (155-158) und am Abbau von Quercetin mittels Quercetinase (159) vorgeschlagen worden. Auch die antimikrobielle Wirkung von Leukocyten ist zum Teil auf die Produktion von Singulett-Sauerstoff zurückgeführt worden (160,161). Auf die Beteiligung von angeregten Sauerstoffspezies an inflammatorischen Reaktionen soll näher eingegangen werden.

1.6. Zur Pathobiochemie der Inflammation

1.6.1. Mögliche Beteiligung angeregter Sauerstoffspezies an inflammatorischen Prozessen

Mehrere Autoren konnten zeigen, daß Leukocyten und Makrophagen in der Lage waren, Superoxidradikale zu produzieren und sie auch freizusetzen (160,162-165). Oyanagui demonstrierte, daß die Superoxidproduktion mit Hilfe von Pt(IV)-Ionen (166) oder Phosphat, Pyrophosphat bzw. Adenin-Nukleotiden (167) stimuliert wird. Er fand, daß einige antiinflammatorische Mittel die Erzeugung von Superoxid in Makrophagen unterbanden (168).

Untersuchungen von McCord ergaben, daß Cuprein, Katalase und t-Butanol in der Lage waren, die oxidative Zersetzung von Hyaluronsäure sowie von der Gelenkflüssigkeit aus Rindern durch das Hypoxanthin-Xanthinoxidase-System verhindern konnten (75). Daraus zog er den Schluß, daß $^{\cdot}OH$-Radikale,

die durch die Reaktion von $\cdot O_2^-$ mit H_2O_2 produziert werden, für die inflammatorische Arthritis verantwortlich sind. Unterstützung fand er im Befund von Oyanagui, daß 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase, die Ratten intravenös injiziert wurde, die Prostaglandin-bedingte Schwellphase des "Carrageenan" Fußödems unterdrücken konnte (169).

Erhärtet wurden diese Befunde durch die Feststellung, daß ein von Huber et al. isoliertes, antiinflammatorisch wirksames Protein sich als Cuprein identifizieren ließ (170). Als "Orgotein" soll das Enzym als Mittel zur Bekämpfung von Entzündungen eingesetzt werden. Die pharmakologisch-toxikologischen Aspekte wurden untersucht (171) und die klinischen Versuche zum Teil durchgeführt (172).

1.6.2. Die antiinflammatorische Wirkung verschiedener Cu-Komplexe

Während inflammatorischer Arthritis-Erkrankungen steigt die Konzentration des Kupfers im Serum merklich an (173). Sorenson konnte zeigen, daß die Cu(II)-Komplexe einer großen Anzahl von antiarthritischen Substanzen, so verschiedene Salicylatderivate, Indomethazin, D-Penicillamin u.a., eine höhere antiinflammatorische Aktivität als die Muttersubstanzen aufweisen (174,175). Diese Komplexe zeigten ferner eine geringere Toxizität als die Liganden und verhinderten außerdem die Bildung von Magengeschwüren. Die "Anti-Ulkus-Aktivität" von Kupferkomplexen konnte auch von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (176,177). Rainsford und Whitehouse wandten ein, daß Cu-Acetylsalicylat nur bei subkutaner Injektion eine höhere antiinflammatorische Aktivität als Aspirin aufweist, nicht aber bei oraler Aufnahme (178). Diese Ergebnisse wurden von Sorenson kritisch diskutiert (179). Aufgrund seiner Beobachtungen entwickelte er die Theorie, daß die antiinflammatorischen

Mittel in vivo zunächst Kupferionen binden und daß diese Chelate erst die klinische Wirkung zeigen (174,175):

Dabei wird das Cu im Magen gebunden, so daß ein lokaler Kupfermangel auftritt. Dieser führt zu einer Störung der Schleimhautmembran und so letzten Endes zum Geschwür.

Da viele Cu-Komplexe mit $\cdot O_2^-$ reagieren, lag es nahe, einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von Sorenson und einer möglichen Reaktion der Cu-Chelate von antiarthritischen Mitteln mit angeregten Sauerstoffspezies, die wahrscheinlich an inflammatorischen Reaktionen beteiligt sind, herzustellen. Jedoch sollte dabei nicht außer acht gelassen werden, daß Prostaglandine auch eine Rolle bei der Inflammation spielen (180,181). PGE_2 wurde aus biologischen Sekreten von entzündeten Rattengeweben isoliert (182) und PGE_1 zeigte einen chemotaktischen Einfluß auf Leukocyten (183). In verschiedenen Testsystemen konnte ferner gezeigt werden, daß antiinflammatorische Mittel die Prostaglandinbiosynthese inhibieren (184-189). Da jedoch Superoxid an der Prostaglandinbildung wahrscheinlich beteiligt ist (169), könnten die Cu-Komplexe durch Abfangen der Sauerstoffradikale auch die PG-Biosynthese hemmen.

1.7. Blaue Kupferproteine als mögliche Reaktionspartner für angeregte Sauerstoffspezies im zellulären Geschehen

Blaue Kupferzentren kommen in mehreren Oxidasen vor (190). Die Rolle des Kupfers ist im allgemeinen ein Elektronentransfer auf Sauerstoff (88); der Mechanismus dieser Elektronenübertragung ist noch nicht in allen Einzelheiten be-

kannt (191,192).

Während der photosynthetischen Reduktion des Sauerstoffs wird $\cdot O_2^-$, höchstwahrscheinlich unter Beteiligung des Plastocyanins, gebildet (193). Auch während der Reduktion des Sauerstoffs durch die Cytochromoxidase, die auch ein dem Plastocyanin und den Azurinen ähnliches, Cu-haltiges Polypeptid enthält und von der ein Strukturmodell existiert (194), entsteht Superoxid. Dieses konnte als Zwischenprodukt mit Hilfe von schnellen Tieftemperaturspektroskopie-Methoden identifiziert werden (195,196). Das "blaue" Kupfer ist höchstwahrscheinlich an dieser Sauerstoffreduktion beteiligt.

1.7.1. Strukturmodelle für die blauen Kupferproteine

Die intensive Absorptionsbande der blauen Cu-Proteine bei 600 nm wurde auf d-d- oder aber hauptsächlich auf S(π)→Cu Charge-Transfer-Übergänge zurückgeführt. Die besonderen EPR-Parameter können auf die besondere Struktur dieser Proteine beruhen (86,190). Um die genaue chemische Struktur des aktiven Zentrums zu ermitteln, wurden verschiedene indirekte Methoden angewandt. Die Resonanz-Raman-Bande bei 270 cm^{-1}, die bei allen blauen Cu-Proteinen gemessen wird, wurde auf eine Cu-S-Streckschwingung zurückgeführt und daraus ein S(π)→Cu-Charge-Transfer gefolgert (197,198). Mit Hilfe der ENDOR-Methode ("Electron nuclear double resonance") konnte Rist zeigen, daß mehr als eine stickstoffhaltige Gruppe zum Signal beiträgt (199). Die Koordinationsgeometrie liegt zwischen einer planaren, der üblichen Struktur für vierfach koordiniertes Cu(II) und einer tetraedrischen, für vierfach koordiniertes Cu(I) charakteristischer Anordnung (200,201). Solomon und seine Mitarbeiter schlugen aufgrund von chiroptischen Messungen und Ligandenfeldberechnungen ein Modell für blaue Kupferzentren

vor: das aktive Zentrum soll eine CuN_2N^*S-Einheit darstellen (N^* ist ein Peptid-Stickstoff) (202).

Eine gute Annäherungsmethode zum Studium der Struktur und der Funktion von Proteinen und Enzymen, die ja komplexe Makromoleküle sind, ist die Untersuchung von einfacheren Molekülen, die einige der essentiellen Eigenschaften der Makromoleküle aufweisen. Da diese Modellkomplexe einfacher zu untersuchen sind, kann man die auf diesem Weg gewonnenen Erkenntnisse auf die ursprünglichen Makromoleküle extrapolieren. Jedoch sind Strukturmodelle der aktiven Zentren von Metallenzymen nicht einfach zu erhalten, da diese im nativen Zustand sich in einem gespannten Zustand (sog. "entatic state") befinden (203). Das Makromolekül induziert wahrscheinlich diese ungewöhnliche Geometrie. Dennoch wurden mehrere Modellkomplexe synthetisiert, die einige Charakteristika verschiedener Metallproteine besitzen. Bei solchen Untersuchungen muß allerdings stets beachtet werden, daß es sich bei den niedermolekularen Chelaten um M o d e l l e und nicht um K o p i e n handelt.

Viele niedermolekulare Cu-Komplexe, die einige der ungewöhnlichen spektralen Eigenschaften blauer Kupferzentren zeigen, wurden synthetisiert (für einen Überblick siehe 85). Bei all diesen Komplexen deuten die spektralen und elektrochemischen Analogien zu den blauen Proteinen auf eine Thiolat- und/oder eine Thioäther-Koordination des Kupfers hin. Stickstoff wird auch als Ligand vermutet.

Die Absorptionsbande nahe 600 nm kann bei all diesen Komplexen auf einen $S(\pi) \rightarrow Cu$-Charge-Transfer-Übergang zurückgeführt werden. Die erste Gruppe dieser Komplexe stellen die Cu-Thioätherchelate dar (204-207). Hier beeindrucken vor allem die hohen positiven Redoxpotentiale. Sugiura et al. beschrieben Cu-Komplexe von thiolathaltigen Peptiden, die einige der spektralen Charakteristika der blauen Kupferproteine aufwiesen (208-210). Der Cu-Komplex von 1-Mer-

captopropionylglycin (208) und vor allem der Cu-N-Mercaptoacetyl-L-Histidin-Komplex (210) zeigten eine große Ähnlichkeit mit den aktiven Zentren blauer Proteine. Makromolekulare Cu-Chelate mit Polythioverbindungen, so das $Cu_{14}[SC(CH_3)_2CHNH_2COO]_{12}Cl\cdot\sim 18H_2O$ (211) oder das $Cu_{14}[SC(CH_3)_2CH_2NH_2]_{12}Cl\cdot\sim 3{,}5\ SO_4^{2-}\cdot\sim 19H_2O$ (212) wurden ebenfalls als Modelle der blauen Kupferzentren vorgeschlagen, ebenso der Bis(Imidotetraphenyldithiophosphino-S,S') Cu(II)-Komplex (213), bei dem ein CuS_4-Cluster gebildet wird. Am eindrucksvollsten sind zwei Modellchelate beschrieben worden, bei denen 1-Methyl-2-mercaptoimidazol als Ligand dient (214). Vor allem die EPR-Parameter des $Cu(1\text{-Methyl-2-mercaptoimidazol})_2$ erinnern an EPR-Spektren blauer Cu-Proteine (215). Erst neuerlich konnte ein Redox-Paar der Struktur $Cu(I)N_3(SR)$ bzw. $Cu(II)N_3(SR)$ synthetisiert werden (216). Dessen Stabilität läßt jedoch zu wünschen übrig. Die Absorptions-, IR- und EPR-Eigenschaften sind jedoch mit denen der blauen Cu-Zentren durchaus vergleichbar, wenn auch nur bei tiefen Temperaturen.

All diese Komplexe können natürlich kein definitives Bild der genauen Struktur aktiver Zentren von blauen Kupferproteinen geben. Sie zeigen jedoch viele von deren Charakteristika und tragen so zum Verständnis deren Struktur und Funktion bei.

1.7.2. Zur Struktur-Funktions-Korrelation

Um die Funktion eines Moleküls genau verstehen und untersuchen zu können, ist die Kenntnis dessen Struktur von großer Bedeutung. So wird zum Beispiel beim Elektronentransport innerhalb der verschiedenen Cytochrome noch gerätselt, wie die Elektronen an das im Inneren der Proteine verborgene Häm-Eisen gelangen. Vorgeschlagen wurden unter anderem eine primäre Akzeptorstelle für Elektronen, die

dann "weitergeleitet" werden, oder sogenannte "Tunnel", durch die das Elektron an das aktive Zentrum herankommt. Zur Lösung dieses Problems wäre eine genaue Röntgenstrukturanalyse notwendig, die dann z.B. zeigen könnte, daß aromatische Aminosäurereste übereinander gestapelt sind und somit eine Art elektrophilen Tunnel bilden.

Ein genauerer Mechanismus der Reaktion von Cupreinen mit Superoxid konnte erst dann postuliert und experimentell verifiziert werden (126), nachdem die Röntgenstrukturanalyse dieses Proteins bekannt wurde (98,99). Erst nachdem gezeigt wurde, daß Cu und Zn einen gemeinsamen Histidin-Liganden besitzen, konnten McAdam et al. ihre Pulsradiolyse-Ergebnisse dahingehend interpretieren, daß der gemeinsame Ligand durch Protonierung und Deprotonierung an der Katalyse der $^{\cdot}O_2^-$-Dismutation direkt beteiligt ist (126). Somit konnte auch eine funktionelle Bedeutung dem Zink zugeschrieben werden.

Für Metallproteine sind Methoden der Strukturuntersuchung besonders wichtig, die Auskunft über den Oxidationszustand des Metalls und über dessen chemische Umgebung geben. Außer den gängigen spektroskopischen Methoden bieten sich hier besonders die Mössbauer- und die Röntgenphotoelektronenspektroskopie an. Bei der Mössbauerspektroskopie handelt es sich um die Messung der Resonanzfluoreszenz rückstoßfreier γ-Strahlung der Atomkerne. Diese hängt vom chemischen Bindungszustand ab. Um die Resonanzfluoreszenz zu erhalten, müssen Strahlungsquelle und Probe relativ zueinander bewegt werden, dann wird die Intensität der Resonanzfluoreszenz gegen die Geschwindigkeit dieser relativen Bewegung aufgetragen (217). Die Methode konnte bei der Strukturuntersuchung der aktiven Zentren verschiedener Eisenproteine angewandt werden, so z.B. die Ferredoxine (218) oder das Adrenodoxin (219). Da jedoch nicht alle Metalle den Mössbauer-Effekt zeigen, ist in solchen Fällen die XPS-Spektroskopie die Methode der Wahl.

Bei der Röntgenphotoelektronenspektroskopie wird die Probe mit Röntgenstrahlen bekannter Energie bestrahlt. Die kinetische Energie (E_{kin}) der austretenden Elektronen aus den inneren Schalen wird mit Hilfe eines hochauflösenden Elektronenspektrometers ermittelt. Die Bindungsenergie (E) läßt sich aus der Beziehung

$$E_b = E_{Röntgen} - E_{kin}$$

berechnen (220). Die Grundlagen zur Ermittlung der Oxidationsstufe des Kupfers in den verschiedenen chemischen Umgebungen wurden von Rupp und Weser intensiv bearbeitet (221-224). Das in foetalem und Hefe-Cu-Thionein enthaltene Metall konnte so als Cu(I) identifiziert werden (225,226). Aufgrund apparativer Unzulänglichkeit läßt sich der Oxidationszustand von Cu in größeren Proteinen, die verhältnismäßig wenig Metall enthalten, nicht eindeutig bestimmen.

Solche Schwierigkeiten treten bei Se und S nicht auf (227). Jedoch können gemessene Werte unterschiedlich interpretiert werden. So wurde bei einigen blauen Proteinen, v.a. Plastocyanin, neben der Thiolatschwefel-Bande um 163 eV eine Bande höherer Bindungsenergie (167-168 eV) gemessen. Solomon et al. (228,229) führten dieses Phänomen auf das Vorkommen einer S^+-Spezies zurück, die durch die Cu-S-Koordination entstanden sein sollte. Dagegen halten Peeling et al. diese Bande für eine Folge der Verunreinigung durch SO_4^{2-}-Ionen (230).

1.8. Engere Problematik

Um die Reaktivität der superoxiddismutativ wirksamen niedermolekularen Cu-Komplexe mit Superoxid besser definieren zu können, muß eine Entscheidung getroffen werden, ob diese Chelate direkt mit Superoxidradikalen reagieren oder

aber ob sie die spontane Disproportionierung von Superoxidionen katalytisch beschleunigen. Hierbei soll eine Produktanalyse durchgeführt werden, d.h. die gebildeten Mengen an O_2 und H_2O_2 bei der Superoxiddismutation in Abwesenheit sowie in Gegenwart von Cuprein und den SOD-aktiven Cu-Komplexen sollen bestimmt und miteinander verglichen werden.

Da viele der indirekten Bestimmungsmethoden zum Nachweis für die Beteiligung von Superoxidradikalen an biochemischen Reaktionen angewandt werden, soll die Spezifität einiger dieser Tests für Superoxid mit Hilfe der niedermolekularen Cu-Chelate, die eine Superoxiddismutase-Aktivität aufweisen, geprüft werden. Die Rolle von $^{\cdot}O_2^-$ bei der Reduktion von Nitrotetrazoliumblau und dessen Derivaten, bei der Autoxidation von Adrenalin und Dihydroxyfumarsäure sowie bei der Oxidation von Hydroxalamin, soll untersucht werden. Ferner soll geprüft werden, ob einige Fe- und Mn-Aminosäurekomplexe, auch das natürlich vorkommende Ferricrocin, die Fähigkeit zur Katalyse der spontanen Superoxiddismutation besitzen.

Die zentrale Problemstellung in dieser Arbeit stellt die Rolle von Sauerstoffradikalen bei inflammatorischen Reaktionen und der Wirkungsmechanismus einiger antiinflammatorisch wirksamer Cu-Chelate dar. Zunächst soll mit Hilfe von indirekten Bestimmungsmethoden geprüft werden, ob die antiinflammatorisch aktiven Komplexe von Cu mit verschiedenen Salicylaten und mit D-Penicillamin eine Superoxiddismutase-Aktivität besitzen. Die Pulsradiolyse soll zeigen, daß diese Komplexe tatsächlich mit $^{\cdot}O_2^-$ reagieren und die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktionen sollen ermittelt werden.

Da das Kupfer im $Cu_{14}(D\text{-Penicillamin})_{12}Cl^{5-}$-Komplex als $3d^{10}$ Cu (Cu(I)) vorliegt, soll mit Hilfe der Röntgenphotoelektronenspektrometrie der Oxidationszustand des Cu vor und nach der Reaktion mit Superoxid bestimmt werden, um

die Spezies, die am Redox-Cyclus beteiligt ist, zu ermitteln. Zur Kontrolle soll der Zustand des Kupfers in den Cu-Salicylaten ebenfalls mit Hilfe der XPS-Methode bestimmt werden. Zur weiteren Überprüfung der Beteiligung von Kupfer als Cu(I) im Cu-Penicillamin an dem katalytischen Cyclus soll der Einfluß von ÄDTA und KCN, die Cu(II)-Reaktionen blockieren, geprüft werden.

Einige Goldkomplexe sind antiinflammatorisch aktiv. Um ihren Wirkungsmechanismus mit dem der Salicylate zu vergleichen, soll geprüft werden, ob Aurothiomalat und Aurothioglucose Superoxiddismutase-Aktivität aufweisen. Zum Vergleich sollen die entsprechenden Kupferkomplexe synthetisiert und auf deren Fähigkeit zur Katalyse der spontanen Dismutation von $^{\cdot}O_2^-$ untersucht werden.

Zur Überprüfung der Fähigkeit der Cu-Salicylate, im zellulären Geschehen ebenfalls effektiv mit Superoxid zu reagieren, soll deren Fähigkeit zur Hemmung der mikrosomalen Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin und der Hydroxylierung von Benzo-[a]-pyren getestet werden.

Die Prostaglandine spielen eine Rolle bei der Entwicklung inflammatorischer Reaktionen. Es soll daher der Einfluß der entzündungshemmenden und SOD-aktiven Cu-Komplexe auf die Prostaglandinbiosynthese untersucht werden und mit der Wirkung der Liganden, die ebenfalls antiinflammatorisch wirksam sind, verglichen werden.

Der Vorschlag, daß $^{\cdot}OH$-Radikale, die durch die Reaktion von $^{\cdot}O_2^-$ mit H_2O_2 entstehen sollen, für Entzündungsreaktionen verantwortlich sind, so z.B. für die Zersetzung der Synovialflüssigkeit bei inflammatorischer Arthritis, soll überprüft werden. Sauerstoffradikale sollen auf enzymatischem oder rein chemischem Wege hergestellt werden oder aber mit Hilfe der Röntgenradiolyse des Wassers. Weitere Versuche sollen durchgeführt werden um festzustellen, ob möglicher-

weise aus $^{\cdot}O_2^-$ entstandene $^{\cdot}OH$-Radikale bzw. Singulett-Sauerstoff sich nachweisen lassen.

Mit Hilfe der niedermolekularen, SOD-aktiven Cu-Chelate soll die Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an der enzymatischen Katalyse der Diaminoxidase und Monoaminoxidase geprüft werden.

Da blaue Kupferproteine Reaktionspartner für Superoxid im zellulären Geschehen sind, soll am Beispiel von Plastocyanin und einigen Modellkomplexen für blaue Kupferzentren die Reaktivität mit $^{\cdot}O_2^-$ untersucht werden. Zuvor soll anhand von chiroptischen und XPS-spektrometrischen Messungen versucht werden, den Cu-Chromophor, sowohl im Plastocyanin als auch in den Modellchelaten, näher zu charakterisieren. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Frage, ob Cu in der $3d^9$- oder in der $3d^{10}$-Form vorliegt und in welcher Art der Schwefelligand an der Bindung des Kupfers beteiligt ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Sigma, München:	β-D-Thioglucose, Hydroxylamin·HCL, Sulfanilsäure, α-Naphtylamin, Diaminoxidase aus Schweinenieren, Aurothioglucose, Mercaptobernsteinsäure (Dinatriumsalz).
Miles, Frankfurt:	Monoaminoxidase aus Rinderplasma
Boehringer, Mannheim:	Katalase aus Rinderleber, Xanthinoxidase aus Kuhmilch, Xanthin, Albumin aus Rinderserum
Serva, Heidelberg:	p-Aminosalicylsäure (Na-Salz)·$2H_2O$, p-Nitrotetrazoliumblauchlorid (NBT), Tetrazoliumblauchlorid (BTC), Neotetrazoliumchlorid (NTC), 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), Thiocarbamyl-Nitro-Tetrazoliumblau (TC-Nitro-BT), Distyrylnitroblautetrazoliumchlorid (DS-NBT), 3(4,5-Dimethylazolyl-2)2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)
Fluka, Buchs:	Glutathion, Adrenalin, Fe(III)-Perchlorat, α-Mercaptopropionylglycin, 1,4-Diaminobutan-Dihydrochlorid, 2-Aminobenzaldehyd, 2-Mercaptobenzothiazol, Benzylamin, Natriumdiäthyldithiocarbamat, D-Penicillamin

Ega-Chemie, Steinheim:	3,5-Diisopropylsalicylsäure, D,L-Mercaptobernsteinsäure Dinatrium Goldsalz·H_2O, 2-Mercapto-1-methylimidazol
Schuchardt, München:	Hypoxanthin
Feback, Berlin:	Leukokristallviolett
Riedel-De Haën, Hannover:	$Cu(CH_3COO)_2$
K&K, Hollywood:	Kaliumsuperoxid
Technosa AG, Pully Lausanne:	^{14}C-Arachidonsäure
Pharmacia, Uppsala:	Sephadex G-10, G-25 und G-75
Whatman, Maidstone:	DEAE-23 Cellulose
Biorad, Richmond:	Biogel P-6, P-10, Chelex-100 (Na-Form)

All diese Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Die sonst benützten Reagenzien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen. Ferricrocin wurde mir freundlicherweise von Herrn Dipl.-Biochemiker M. Kappner zur Verfügung gestellt. Cu-N-Mercaptoacetylglycyl-L-Histidin wurde mir von Dr. Y. Sugiura, Kyoto, Japan, überlassen. Hyaluronsäure war ein Geschenk von Frau Dr. R. Brigelius, Münster.

Das verwendete Wasser war deionisiert und zusätzlich quartzdestilliert. Das für die Pulsradiolyse-Experimente benutzte Wasser war dreimal destilliert und pyrrolysiert.

2.2. Geräte

Kühlzentrifugen:
Beckmann J-21 B,
MSE Mistral 6L und
MSE Highspeed 18
Fraktionssammler mit Uvicord II und Schreiber von LKB, Stockholm
Amicon Ultrafiltrationsgeräte mit UM-2 Filter
Lyophilisator von Colora, Lorch
pH-Meter 22 von Radiometer, Kopenhagen
Perkin-Elmer 240 Elementaranalyse-Einheit
Spektralphotometer:
Beckmann DB-GT und
Unicam SP 1800 mit Schreiber von Phillips
JASCO 20 CD-Spektrometer
Atomabsorptionsspektralphotometer:
M4 QIII Zeiss mit Linecomb-Schreiber und Cu- und Zn-Hohlkathodenlampen sowie
Perkin-Elmer 400S mit einer HGA 76B Programmiereinheit
Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzzusatz 1030 der Firma Netheler und Hinz, Hamburg
Clark Sauerstoffelektrode, hergestellt in der Werkstatt des Physiologischen Instituts in Marburg
Tricarb Szintillationsspektrometer 2009 von Packard Instruments
Varian V IEE 15 hochauflösendes Elektronenspektrometer mit einem on-line 620 L Computer (8K)
Febetron Pulsradiolysegerät mit den optischen Anzeigegeräten: Zeiss PMQ II Monochromator, EMI 9659 QB Photomultiplier, Tectronix
7704 Oszilloskop
Lichtquelle: Xenonlampe Osram XBO 450, W/4
Spectrosil Quarzküvette (Lichtweg 2 cm)
Siemens Dermopan Röntgenradiolyseeinheit
Mikro-KPG-Ubbelohde Viskosimeter von Schott, Mainz, Meßbereich 0,4-6 cST.

2.3. Präparationen

2.3.1. Isolierungen von biologischem Material

2.3.1.1. Cuprein

Erythrocuprein (2Cu,2Zn-Superoxiddismutase) wurde nach der in (231) angegebenen Methode isoliert. Die Erythrocyten wurden aus Citratblut durch Zentrifugation bei 1800 g isoliert, gewaschen und bei 4°C über Nacht hämolysiert. Auf eine Chloroform/Äthanol-Fällung und eine Phosphattrennung folgte eine erneute Fällung mit Aceton. Der Niederschlag wurde gelöst, über eine Sephadex G-75-Säule und anschließend über eine DEAE-23-Cellulose-Säule gereinigt.

2.3.1.2. Plastocyanin aus Petersilie

Plastocyanin wurde nach einer verfeinerten Version der Methode von Graziani et al. (232) aus Petersilienblättern gewonnen. 1000 g gewaschene Petersilienblätter wurden mit 900 g Eis, 1 l Aceton (destilliert) und 100 ml 1 M Tris·HCl-Puffer, pH 7,6, versetzt und homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat durch Nylon-Stoff filtriert und das Filtrat bei 5000 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Es folgte eine Fällung durch das 1,16-fache Volumen an destilliertem Aceton. Nach dem Sedimentieren wurde 30 Minuten lang bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Bodensatz wurde in ca. 20 ml 150 mM Tris·HCL-Puffer, pH 7,6, gelöst und über Nacht gegen denselben Puffer dialysiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (30 Minuten bei 8000 U/min) wurde der Überstand auf eine mit 150 mM Tris·HCl-Puffer, pH 7,6, äquilibrierte DEAE-23-Cellulose-Säule (4 x 23 cm) gegeben und so lange mit dem Puffer nachgewaschen, bis die Absorption bei 280 nm unter 0,15 lag. Dann wurde ein Gra-

dient von 150-280 mM Tris·HCl, pH 7,6, angelegt. Die Cu-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration eingeengt und auf eine Biogel P-10-Säule (3 x 92 cm) aufgetragen und mit 50 mM Tris·HCl, pH 7,6, eluiert. Beide Säulenreinigungsschritte wurden wiederholt. Das so erhaltene Protein zeigte in der Disc-Elektrophorese eine scharfe Bande.

Zur Oxidation des Plastocyanins wurde eine äquimolare Menge $K_3[Fe(CN)_6]$ zugegeben und anschließend sofort über eine Biogel P-10-Säule entsalzt.

2.3.1.3. Reinigung kommerzieller Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase wurde durch Gelfiltration (Sephadex G-75) von Verunreinigungen befreit. Anschließend wurde sie gegen 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, dialysiert. Die so erhaltene Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration der Xanthinoxidase in den Lösungen wurde durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm ($E_{280} = 2{,}04 \cdot 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$ (233)) gemessen.

2.3.1.4. Mikrosomen

Intakte induzierte Lebermikrosomen wurden nach der Standardmethode von Remmer et al. isoliert (234). Die Induktion von Cytochrom P-450 erfolgte durch intraperitoniale Injektionen (in vier Tagen) von 80 mg Natriumphenobarbital in physiologischer Kochsalzlösung pro kg Körpergewicht, danach wurde den Tieren 24 h lang das Futter entzogen. Die Induktion des Cytochroms P-448 wurde den Tieren 40 h vor der Tötung durch eine intraperitoniale Injektion von 20 mg Methylcholanthren, suspendiert in 0,5 ml Olivenöl, verabreicht.

2.3.2. Synthese von Kupferkomplexen

2.3.2.1. Cu-Aminosäure-Komplexe

$Cu(Lysin)_2$ und $Cu(Tyrosin)_2$ wurden nach der in (131-133) angegebenen Methode aus den entsprechenden Aminosäuren und einem Überschuß an CuO hergestellt. Die Reinheit dieser Komplexe wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gesichert (131).

2.3.2.2. Cu-Salicylate

Cu(II)-Salicylat wurde wie von de Alvare et al. (235) beschrieben synthetisiert. Nach dergleichen Methode wurde Cu(II)-p-Aminosalicylat hergestellt. Cu(II)-Acetylsalicylat und Cu(II)-3,5-Diisopropylsalicylat wurden aus $CuCl \cdot 2H_2O$, 50 %iger NaOH und den Liganden hergestellt und aus Äther umkristallisiert (174).

2.3.2.3. Cu-Penicillamin

$[Cu_{14}(D\text{-Penicillamin})_{12}Cl]^{5-}$ wurde nach der in (222,223) beschriebenen Methode dargestellt. 0,666 mMol D-Penicillamin (β,β-Dimethylcystein) wurden unter Argon zu einer wässrigen Lösung von 0,5 mMol $Cu(CH_3COO)_2$ und 1,5 mMol NaCl zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit einem Überschuß an Chelex-100 (Na-Form) behandelt, filtriert, über Sephadex G-25 gereinigt und lyophilisiert.

2.3.2.4. Strukturmodelle der blauen Cu-Proteine

Cu-α-Mercaptopropionylglycin wurde nach der in (208) angegebenen Methode hergestellt. Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$ wurde aus $Cu(CH_3COO)_2$ und einer alkoholischen Lösung des Liganden (Verhältnis Cu:Ligand = 1:2) wie in (214) beschrieben synthetisiert. Für die Präparation des Cu_7(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2(ClO_4)_2$-Komplexes wurde der siebenfache Überschuß an $CuClO_4 \cdot 4CH_3CN$ (gelöst in Acetonitril/Wasser 1:1) zu einer 1:1-Mischung aus $Cu(CH_3COO)_2$ und 1-Methyl-2-mercaptoimidazol zugegeben (214).

2.3.2.5. Andere Komplexe

Cu-Diäthyldithiocarbamat wurde durch Mischen einer alkoholischen Lösung von $CuCl_2$ mit einer wässrigen Lösung des Liganden hergestellt. Es folgten zwei Umkristallisationsschritte aus Chloroform. Cu(Äthylendiamin)$_2(SCN)_2$ wurde unter Verwendung von $Ba(SCN)_2$ wie von Brown und Lingafelter beschrieben synthetisiert (236). Die weiteren Cu-Komplexe wurden durch Umsetzen von Cu-Salzlösungen mit Lösungen der Liganden erhalten.

Mn-Aminosäurekomplexe wurden durch Umsetzung entweder von $MnCl_2$ oder von MnO mit den Liganden hergestellt. Die Synthese der Fe(III)-Chelate von Glycin, Histidin, Serin und Phenylalanin der allgemeinen Zusammensetzung Fe_3O(Aminosäure)$_6(ClO_4)_7 \cdot 3H_2O$ erfolgte durch Zugabe der berechneten Menge 0,1 M, wässriger Fe(III)-Perchloratlösung zur kristallinen Aminosäure (im molaren Verhältnis 1:2) (237).

2.4. Analytik

2.4.1. Elementaranalyse

C,H,N-Analysen wurden in einer Perkin-Elmer 240 Einheit durchgeführt. Schwefel wurde nach der in (238) beschriebenen Methode quantifiziert. Der Metallgehalt wurde mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie (Zeiss M4Q III kombiniert mit PMQ II und einem Linecomb Schreiber) bestimmt. Als Brenngas wurde ein Acetylen-Luft-Gemisch verwendet. Die Monochromatoreinstellung war 324,7 nm für Cu und 213,8 nm für Zn. Bei allen untersuchten Komplexen lagen die Abweichungen der durch Elementaranalyse erhaltenen Werte von den theoretischen Werten innerhalb von 3 %.

2.4.2. Spektroskopie

2.4.2.1. Vis/UV-Spektrometrie

UV- und sichtbare Spektren wurden in einem Unicam SP 1800 Spektralphotometer aufgenommen.

2.4.2.2. Circulardichroismus

CD-Messungen wurden an einem JASCO JA 20 A Spektralpolarimeter durchgeführt. Die Aufnahmebedingungen wurden für jede Messung optimiert. Zur Auswertung der Spektren wurde die molare Elliptizität nach der Formel

$$\Theta = \frac{a \cdot E \cdot M}{100 \cdot c \cdot l} \qquad \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{Dezimol}}$$

berechnet, wobei M das Molekulargewicht, a die Amplitude des Cottoneffekts in cm, E die Empfindlichkeit in Milligrad/cm, c die Konzentration in mg/ml und l die Schichtdicke der Küvette in dm darstellt.

2.4.2.3. Röntgenphotoelektronenspektrometrie

Feste Proben wurden auf die klebende Seite eines Tesafilms (Scotch Tape, 3 M Co.) gewalzt, flüssige Proben unmittelbar vor der Messung auf Tesafilm, der um den Probenträger gerollt war, lyophilisiert. Die jeweilige Probe wurde mit Röntgenstrahlen der Mg $K_{\alpha 1,2}$, deren Energie 1253,6 eV beträgt, bestrahlt. Die kinetische Energie der austretenden Elektronen wurde in einem hochauflösenden Varian V-IEE 15 Elektronenspektrometer mit einem on-line 620 L Computer (8K) bestimmt. Aus der Differenz beider Energiewerte wurde jeweils die Bindungsenergie berechnet. Die Spektren wurden standardisiert, indem sie auf die C 1s-Linie bei 284,0 eV bezogen wurden. Somit wurden Aufladungseffekte der Probe während des Meßvorgangs kompensiert. Im Falle des Kupfers wurden die Cu $2p_{1/2}$- und Cu $2p_{3/2}$-Niveaus, für Schwefel das S $2p_{1/2,3/2}$-Niveau, gemessen.

2.4.3. Bestimmung von O_2 und H_2O_2

Die bei der Disproportionierung von $\cdot O_2^-$ freiwerdende Menge von O_2 wurde mit einer Clark Sauerstoffelektrode bestimmt. Zur Eichung der Elektrode wurde der Nullwert mit einer Sulfitlösung, der 100 %-Wert mit luftgesättigtem Puffer, festgesetzt. Zu 5 ml Puffer bzw. einer Lösung von Cuprein oder der untersuchten Cu-Komplexe darin wurden 300 µl einer gesättigten Lösung von KO_2 in DMSO zugegeben. Die entwickelte Menge O_2 wurde nach zwei Minuten gemessen.

Die Entwicklung von H_2O_2 bei der Superoxiddismutation wurde mit Hilfe von Leukokristallviolett bestimmt. Für enzymatisch produziertes $^{\cdot}O_2^-$ wurden zu einer Mischung aus 20 mU Xanthinoxidase, 186 µM Leukokristallviolett, 168 µM Peroxidase und dem zu untersuchenden Komplex in 1 ml 0,65 M Acetatpuffer, pH 4,5, 200 µl einer 1 mM Xanthinlösung zugegeben. Anschließend wurde die Absorption des entstehenden Kristallvioletts bei 596 nm verfolgt. Für Experimente mit anorganischem $^{\cdot}O_2^-$ wurden zu einem Gemisch von Leukokristallviolett (186 mM), Peroxidase (168 µM) und dem zu untersuchenden Komplex in 1 ml 0,7 M Acetatpuffer, pH 4,5, 200 µl einer gesättigten Lösung von Kaliumsuperoxid in DMSO hinzupipettiert und die Absorption bei 596 nm gemessen.

2.5. Funktionelle Untersuchungen

2.5.1. Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität

2.5.1.1. Nitrotetrazoliumblau-Reduktion

Die Nitrotetrazoliumblau-Reduktionstests wurden nach den in (21,83) beschriebenen Methoden durchgeführt. Für das Xanthin-Xanthinoxidase System wurde eine Reagenzienmischung hergestellt, die Phosphatpuffer, 0,1 M, pH 7,8, (11 Teile), 1 %ige Gelatinelösung in Phosphatpuffer (5 Teile), Katalase, 6 U/ml (1 Teil) und Nitrotetrazoliumblauchlorid-Lösung im gleichen Puffer, 4 mg/ml (3 Teile) enthielt. Zu 2 ml dieser Mischung wurden 250 µl einer Xanthinoxidase-Lösung (0,2 U/ml in Phosphatpuffer) und 250 µl der zu untersuchenden Lösung hinzugegeben. 30 Sekunden später wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl einer 1 mM Xanthinlösung im Puffer gestartet. Die Absorption bei 540 nm wurde verfolgt. Bestimmt wurden die Bildungsrate des Formazanfarb-

stoffs (ΔA_{540}/min) und die Endabsorption A_{540}.

Zur Durchführung der Reduktion von NBT mittels KO_2 wurden zu 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,8, jeweils 100 µl einer Katalase-Lösung (6 U/ml), 100 µl Nitrotetrazoliumblauchlorid (4 mg/ml) und 200 µl der Testlösung gegeben. Nach Zugabe von 100 µl einer gesättigten Lösung von KO_2 in DMSO wurde die Absorption bei 540 nm gemessen.

2.5.1.2. Adrenalinoxidation

Bei der Adrenalinoxidation durch Xanthin und Xanthinoxidase wurden die Bedingungen von McCord und Fridovich (19) eingehalten. Der Testansatz enthielt, außer der zu testenden Substanz, 0,1 M Glycinpuffer, pH 10,0, Xanthin, $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ M, Adrenalin, $4{,}45 \cdot 10^{-4}$ M und Xanthinoxidase, $1{,}1 \cdot 10^{-8}$ M. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Xanthinoxidase gestartet, dann wurde das gebildete Adrenochrom bei 480 nm bestimmt. Das Gesamtvolumen betrug 900 µl.

Die Adrenalinautoxidation (239,240) wurde ebenfalls bei 480 nm verfolgt. Hierbei enthielt der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 700 µl: 0,1 M luftgesättigten Glycinpuffer, pH 10,0, $5{,}7 \cdot 10^{-4}$ M Adrenalin und den zu untersuchenden Kupferkomplex. Nach Zugabe des Adrenalins wurde die Bildungsrate des Adrenochroms spektrometrisch verfolgt.

2.5.1.3. Cytochrom c-Reduktion

Die Reaktion wurde wie in (241) durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 0,76 ml waren enthalten: HEPES-Puffer, 50 mM, pH 7,8; Xanthin, 0,33 mM; Cytochrom c ox., 27 µM; Katalase, 320 U; Xanthinoxidase, 0,02 U. Die Absorptions-

zunahme bei 550 nm wurde verfolgt und sowohl die Extinktionszunahme pro Minute (A_{550}/min) als auch der Absorptionswert nach 7 Minuten wurden für die Auswertung benützt.

2.5.1.4. Hydroxylamin-Test

Die Hydroxylaminoxidation wurde wie von Elstner und Heupel (23) beschrieben durchgeführt. Der Inkubationsansatz (2 ml) enthielt 0,65 M Phosphatpuffer, pH 7,8, 0,5 µM Hydroxylammoniumchlorid, 0,15 µM Xanthin, 0,02 U Xanthinoxidase und die zu untersuchende Substanz. Nach Start der Reaktion (durch Zugabe der Xanthinoxidase) wurde das Gemisch 20 Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 500 µl des Ansatzes zu 500 µl einer Sulfanilsäurelösung (19 mM) pipettiert; dann wurde jeweils 500 µl einer α-Naphtylaminlösung (7 mM) zugegeben. Nach 20 Minuten wurde zur Bestimmung des gebildeten Nitrits die Extinktion bei 530 nm gemessen.

2.5.1.5. Dihydroxyfumaratautoxidation

Es wurde die in (242) beschriebene Methode angewandt. Zu 500 µl 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, wurden 200 µl einer 618,75 µM NBT-Lösung und 100 µl der Testlösung zugegeben. Dann wurde die Reaktion mit 100 µl einer 36 mM Lösung von Dihydroxyfumarsäure in 0,01 M HCl gestartet. Verfolgt wurde die Koreduktion von Nitrotetrazoliumblau photometrisch bei 540 nm.

2.5.2. Nichtenzymatische Erzeugung von Sauerstoffradikalen

2.5.2.1. Pulsradiolyse

Es wurde eine Febetron-Pulsradiolyseeinheit verwendet. Als Lichtquelle diente eine Osram XBO 450 W4 Xenonlampe. Über Spiegelsysteme wurde der Lichtstrahl vom Bestrahlungsraum in den Meßraum geleitet und dort mit Hilfe eines Detektorsystems (bestehend aus einem Zeiss M4Q III Monochromator, einem EMI 9659 QB Photomultiplier und einem Tectronix 7704 Oszilloskop) gemessen. $^{\cdot}O_2^-$ wurde hergestellt in Konzentrationen zwischen 4 und 35 µM durch hochenergetische Elektronenpulse (1,81 MeV) von 40 ns-Dauer. Das verwendete "Superwasser" war mit Sauerstoff gesättigt und enthielt 10^{-2} M Natriumformiat, um alle Primärradikale in Superoxid umzuwandeln ($G._{O_2^-} = 6,1$). Der pH wurde mit NaOH oder $HClO_4$ auf 7,0 - 7,5 eingestellt. Die Superoxidkonzentration wurde mit Hilfe der Thiocyanat-Dosimetrie bestimmt (243).

Alle Pulsradiolyseexperimente wurden in den Laboratorien der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg bei München, durchgeführt.

2.5.2.2. Kinetische Auswertung der Pulsradiolyseergebnisse

Oszilloskop-Spuren, die den Zerfall von $^{\cdot}O_2^-$ in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener Cu-Komplexe bei 250 nm zeigen, wurden mit einer Polaroidkamera aufgenommen. Die Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung wurden mit Hilfe eines Wang 2200 Computers in einem zu dem in (118) analogen Programm berechnet ($\ln A = f(t)$). Die Konstanten zweiter Ordnung werden aus diesen und den Komplexkonzentrationen kalkuliert (131-133).

2.5.2.3. Röntgenradiolyse

Die Röntgenradiolyseexperimente wurden in einer Siemens Dermopan Einheit durchgeführt. Die Röntgenspannung betrug 50 kV und wurde bei 5 bis 25 mA betrieben. Die Dosis betrug ungefiltert 8 krad/min. Zur Reduktion der Dosisleistung wurden ein 1 mm- und ein 10 mm-Aluminium-Filter eingesetzt. Die Küvette wurde vor und während der Bestrahlung mit O oder N begast. Die Dosisleistung in der Küvette wurde mit Hilfe des Fricke-Dosimeters (244) bestimmt, wobei Fe^{2+} beim Bestrahlen zu Fe^{3+} oxidiert wurde, das bei 302 nm eine charakteristische Absorption aufweist. Die Dosis wurde berechnet aus der Beziehung

$$D\ (krad) = 30 \cdot \Delta A_{302\ nm}$$

Aus dieser Größe (D) und dem G-Wert der produzierten Radikale (Menge der erzeugten Radikale pro 100 eV absorbierter Energie) ließ sich die Radikalkonzentration berechnen.

2.5.3. Beteiligung von aktiviertem Sauerstoff an weiteren enzymatischen Reaktionen

2.5.3.1. Mikrosomale Dealkylierungs- und Hydroxylierungsreaktionen

Die Beteiligung von 7-Äthoxycoumarin wurde nach der Methode von Ullrich und Weber (245) fluorimetrisch bestimmt. Der Inkubationsansatz enthielt in 1 ml 150 mM KCl, 50 mM Tris·HCl, pH 7,75, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Nikotinamid, 7 mM Isocitrat, 0,4 U Isocitratdehydrogenase und 100 µM 7-Äthoxycoumarin. In diese Mischung wurde 1 mg mikrosomalen Proteins suspendiert. Nach Zugabe von 1 mM NADPH wurde die Mischung bei 22°C inkubiert und nach 10 Minuten die Fluoreszenz durch Zugabe einer definierten Menge Umbelliferon kalibriert.

Die Benzo-[α]-pyren-Hydroxylase-Aktivität wurde in dem gleichen Inkubationsansatz gemessen, mit der Ausnahme, daß statt 7-Äthoxycoumarin 80 µM ^{3}H-Benzo-[α]-pyren (1 µCi) zugegeben wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 0,5 N NaOH in 80 %igem Äthanol gestoppt, mit 3 ml Hexan extrahiert und nach Zentrifugation die Reaktivität der unteren Phase, die die Stoffwechselprodukte enthielt, bestimmt (246).

Die mikrosomalen Reaktionen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Christoph Richter am Istituto di Patologia Generale, Università di Padova, Italien, durchgeführt.

2.5.3.2. Prostaglandin Synthetase

Die Prostaglandin Synthetase-Aktivität wurde nach der Methode von White und Glassman (247) durchgeführt. 10 µl eines Mikrosomenextrakts aus Samenbläschen vom Stier wurden zunächst mit 50 µl einer Cofaktorlösung, die in Sauerstoff-freiem 0,1 M Tris·HCl Puffer, pH 8,2, jeweils 0,3 mg Glutathion (red.) und Adrenalin enthielt, versetzt. Dann wurden 20 µl ^{14}C -Arachidonsäure (in Äthanol/0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, das 0,02 % Na_2CO_3 und 3 mM $MgCl_2$ enthielt), um eine Endkonzentration von 9 µM zu erreichen ($1{,}1 \cdot 10^6$ cpm), zugesetzt. Die Endkonzentration des mikrosomalen Proteins betrug 0,3 mg/100 µl Testansatz. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden 5 µl einer Lösung von nicht-markiertem Prostaglandin (0,2 mg/ml in absolutem Äthanol) als "Carrier" hinzugefügt. Die Ansätze wurden jeweils auf eine Bio-Sil Säule aufgetragen und wie in (247) beschrieben eluiert. Die Menge der gebildeten Produkte wurde mit Hilfe eines Packard Szintillationsspektrometers bestimmt. Der 100 %-Wert entsprach 24 000 cpm.

Diese Bestimmungen wurden im Research Department, Pharma-

ceutical Division, Ciba-Geigy Ltd., Basel, durchgeführt. Dafür möchte ich Herrn Dr. Ch. Richter recht herzlich danken.

2.5.3.3. Monoaminoxidase

Die Oxidation von Benzylamin wurde spektralphotometrisch bei 250 nm beobachtet (248). Zu 2,5 ml 200 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, wurden 300 µl der Testlösung und 100 µl einer 0,1 M Benzylaminsulfat-Lösung zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Enzymlösung (75 mU/ml) gestartet und bei 27°C verfolgt. Die absolute Menge des verbrauchten Substrats wurde aus der Beziehung

$$\varepsilon_{A250}\ (\text{Benzaldehyd-Benzylamin}) = 11{,}3 \cdot 10^3 \qquad (249)$$

berechnet.

2.5.3.4. Diaminoxidase

Die Diaminoxidase-Aktivität wurde nach Holmstedt et al. (250) bestimmt. 5 ml Inkubationsansatz enthielten 67 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, 2,5 mM o-Aminobenzaldehyd, 10 mM 1,4-Diaminobutan und 180 mU Diaminoxidase. Inkubiert wurde im Wasserbad bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 10 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Nach Zentrifugation wurde der Farbstoff, der durch die Reaktion des gebildeten Aldehyds mit o-Aminobenzaldehyd gebildet wurde, spektralphotometrisch bei 430 nm gemessen. Als Referenzsubstanz diente ein Reagenzienleerwert, bei dem 1,4-Diaminobutan fehlte.

3. ERGEBNISSE

3.1. Produktanalyse der spontanen und katalytisch beschleunigten Superoxiddismutation

Um feststellen zu können, ob es sich bei der beschleunigten Disproportionierung von $^{\cdot}O_2^-$ in Gegenwart von SOD-aktiven Cu-Komplexen um eine echte Katalyse oder aber lediglich um eine direkte Reaktion der Chelate mit Superoxid handelt, mußte eine Produktanalyse durchgeführt werden. Hierbei wurden die gebildeten Mengen O_2 und H_2O_2 aus der gleichen vorgegebenen Menge an $^{\cdot}O_2^-$ in Abwesenheit und in Gegenwart von Cuprein, $Cu(Lys)_2$, $Cu(Tyr)_2$ und $Cu(Salicylat)_2$ bestimmt. Aus der gleichen Menge KO_2 entstand bei der spontanen und bei den katalysierten Reaktionen die gleiche Menge Sauerstoff (Tabelle 1).

Komplex	µg O_2/ml	µg O_2 insgesamt
-	4,0	21,2
Cuprein	3,75	19,9
$Cu(Lys)_2$	3,60	19,1
$Cu(Tyr)_2$	3,75	19,9
$Cu(Salicylat)_2$	3,90	20,6

Tab. 1: Bestimmung der gebildeten Menge O_2 bei der Dismutation von Superoxid. Zu 5 ml H_2O bzw. Komplexlösung wurden 300 µl einer gesättigten Lösung von KO_2 in DMSO hinzupipettiert. Die Menge des gebildeten Sauerstoffs wurde nach 2 Minuten mit Hilfe einer Clark-Elektrode bestimmt. Die Konzentration des Cupreins betrug 3,75 µM, die der Cu-Chelate 250 µM.

Bei einem analogen Experiment wurde die Menge des gebildeten Wasserstoffperoxids bestimmt. Auch hier war die gebildete Menge an H_2O_2 sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart der Cu-Komplexe die gleiche (Tabelle 2).

Komplex	Konzentration µM	A_{596}	$[H_2O_2]$ gebildet µM
-	-	0,830	11,07
Cuprein	0,912	0,815	10,87
Cuprein	0,014	0,790	10,53
$Cu(Tyr)_2$	23,670	0,830	11,07
$Cu(Tyr)_2$	5,915	0,830	11,07
$Cu(Lys)_2$	83,400	0,850	11,33
$Cu(Lys)_2$	20,830	0,845	11,27

Tab. 2: Konzentration des gebildeten Wasserstoffperoxids bei der spontanen und der katalytisch-beschleunigten Superoxiddismutation. Im Testansatz waren vorhanden: 0,7 M Acetatpuffer, pH 4,5, 186 µM Leukokristallviolett, 168 µM Peroxidase und der zu untersuchende Komplex. Nach Zugabe von 200 µl einer gesättigten KO_2-Lösung in DMSO wurde die gebildete Menge H_2O_2 photometrisch bestimmt, indem das durch Reaktion mit dem Leukofarbstoff gebildete Kristallviolett bei 596 nm gemessen wurde.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Bildung von H_2O_2 während der Dismutation enzymatisch erzeugten Superoxids (Xanthin-Xanthinoxidase) bestimmt. Auch hier war die gebildete Menge Peroxids nach Beendigung der Reaktion in allen Fällen die gleiche. Die Bildungsrate war jedoch verständlicherweise in Gegenwart von Cuprein, $Cu(Lys)_2$ und $Cu(Tyr)_2$ höher, was auf eine beschleunigte Bildung der Reaktionsprodukte hindeutet.

In Gegenwart der Cu-Komplexe wird also tatsächlich die spontane Disproportionierung von $^{\bullet}O_2^-$ beschleunigt. Es handelt

sich also bei den Kupferchelaten um niedermolekulare "Superoxiddismutasen".

3.2. Zur Spezifität indirekter Bestimmungen der Superoxiddismutase-Aktivität

Die meisten Bestimmungsmethoden der Superoxiddismutase-Aktivität sind indirekter Natur. Hierzu wird ein Superoxid generierendes System und ein $^{\cdot}O_2^-$-Detektor angewandt. Ist Superoxiddismutase anwesend, so tritt eine Kompetition zwischen ihr und dem Detektor um das Superoxidradikal ein und die Detektor-$^{\cdot}O_2^-$-Reaktion wird verlangsamt. Wenn diese Methoden tatsächliche Indikatoren für die Superoxiddismutase-Aktivität sind, dann müßten die beobachteten Detektorreaktionen spezifisch für Superoxidionen sein.

3.2.1. Nitrotetrazoliumblau-Reduktion

Es konnte gezeigt werden, daß wenn das System Xanthin-Xanthinoxidase als Quelle reduzierender Äquivalente für NBT dient, man zum Erreichen einer 50 %igen Hemmung der Reaktion 1125-mal soviel $Cu(Tyr)_2$-Kupfer und 2150-mal soviel Lysin-gebundenes Cu wie Cuprein-Kupfer brauchte. In diesem Fall entstehen aus dem Flavin-Sauerstoff-Addukt aktiver Xanthinoxidase außer $^{\cdot}O_2^-$ eine ganze Reihe anderer reduzierender Radikale, auch freie Elektronen (251). Dient hingegen KO_2 als reduzierendes Agens, wobei nur Superoxid und dessen direkte Folgeprodukte vorhanden sein können, so braucht man nur noch 365-mal soviele Cu-Ionen, die an Tyrosin gebunden sind, wie Cuprein-gebundene um den gleichen Hemmeffekt zu erhalten. Die Reaktivität des $Cu(Tyr)_2$ wird also um das Dreifache, die des $Cu(Lys)_2$ sogar um das Fünffache gesteigert (21). Dies läßt ernsthafte Zweifel an

der Spezifität dieser Indikatorreaktion für Superoxidradikale zu.

Um die Spezifität dieser Reaktion weiter zu testen, wurden andere Tetrazoliumsalze, sowohl vom Mono- als auch vom Ditetrazolium-Typ, daraufhin getestet, ob sie sich mittels Xanthin und Xanthinoxidase oder KO_2 reduzieren lassen und welchen Hemmeffekt Erythrocuprein auf diese Reduktionsreaktionen zeigt. Diese Salze werden normalerweise zum visualisieren NAD(P)-abhängiger Reaktionen benutzt, wobei NAD(P)H mit Diaphorase-FAD reagiert und das reduzierte Flavin das Tetrazoliumsalz in das entsprechende Formazan überführt. Von Interesse waren die Unterschiede, die zwischen beiden Reduktionssystemen auftauchen könnten (Tabelle 3).

Tetrazoliumsalz	Reduzierbarkeit durch Xanthin-Xanthinoxidase	[EC-Cu] 50 % Hemmung µM	Reduzierbarkeit durch KO_2	[EC-Cu] 50 % Hemmung µM
NBT	+	0,04	+	0,06
BTC	-	-	+	0,30
NTC	+	0,11	+	0,45
TTC	-	-	-	-
TC-Nitro-BT	+	0,14	(+)	nicht er-
DS-NBT	+	0,25	(+)	mittelbar
MTT	+	0,15	+	0,34

Tab. 3: Reduzierbarkeit verschiedener Tetrazoliumsalze durch das Xanthin-Xanthinoxidase- und das KO_2-System und der Hemmeffekt nativer 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase auf die Bildung des jeweiligen Formazans. Die Testansätze enthielten im ersten Fall: 100 mM Phosphat (pH 7,8), 1,4 mg/ml Gelatine, 342 µg/ml Tetrazoliumsalz, 0,14 mM Xanthin, 2 U/ml Katalase und 16,8 mU/ml Xanthinoxidase. Beim KO_2-System waren vorhanden: 100 mM Phosphat (pH 7,8), 160 µg/ml Tetrazoliumsalz, 2,5 U/ml Katalase. Die Werte für die 50 %ige Hemmung durch EC wurden graphisch durch Auftragen der prozentualen Hemmung gegen den Logarithmus der Konzentration des Cuprein-Kupfers ermittelt (21). Die Abkürzungen für die Tetrazoliumsalze sind im experimentellen Teil erklärt. Nur TTC und MTT sind Monotetrazoliumsalze.

Während sich das BTC durch KO_2 reduzieren ließ, zeigte das Xanthin-Xanthinoxidase-System keinen Effekt. Umgekehrt ließen sich TC-Nitro-BT und DS-NBT leicht durch Xanthin und Xanthinoxidase, durch KO_2 jedoch nur sehr schwach in die Formazan-Form überführen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Reduktion der Tetrazoliumsalze nicht nur auf $^{\cdot}O_2^-$ zurückzuführen ist. Eine Spezifität des NBT-Tests für Superoxid ist also nicht gegeben. Dieses wurde auch durch die Arbeiten von Amano et al. (252) bestätigt, die fanden, daß andere Proteine, auch Serumalbumin, die Formazanbildung unterdrücken konnten.

3.2.2. Adrenalinoxidation

Sowohl die Autoxidation (239) als auch die in Gegenwart von Xanthin und Xanthinoxidase beobachtete Oxidation von Adrenalin (19) unter Bildung des Farbstoffs Adrenochrom wurden als schnelle und empfindliche Indikatoren für Superoxid verwendet und oft als Bestimmungsmethoden der Superoxiddismutase-Aktivität benützt. Bors et al. konnten jedoch mit Hilfe der Pulsradiolyse zeigen, daß die Adrenochrombildung keine einfache Reaktion zwischen $^{\cdot}O_2^-$ und Adrenalin ist, sondern über einen komplizierten Mechanismus abläuft (253). Um die Spezifität der Adrenalinoxidation für Superoxid zu überprüfen, wurden einige superoxiddismutativ wirkende Cu-Chelate auf ihre Fähigkeit, die Adrenochrombildung zu unterdrücken, getestet. Jedoch trat der umgekehrte Fall ein. Die Cu-Komplexe beschleunigten in Glycin-Puffer die Autoxidation von Adrenalin sowie die Adrenochrombildung mittels Xanthin und Xanthinoxidase. Die Beschleunigungsrate war in allen Fällen eine logarithmische Funktion der Kupferkonzentration (Abb. 1).

Auf diese Weise konnte für alle eingesetzten Cu-Komplexe die Konzentration graphisch ermittelt werden, die die Bil-

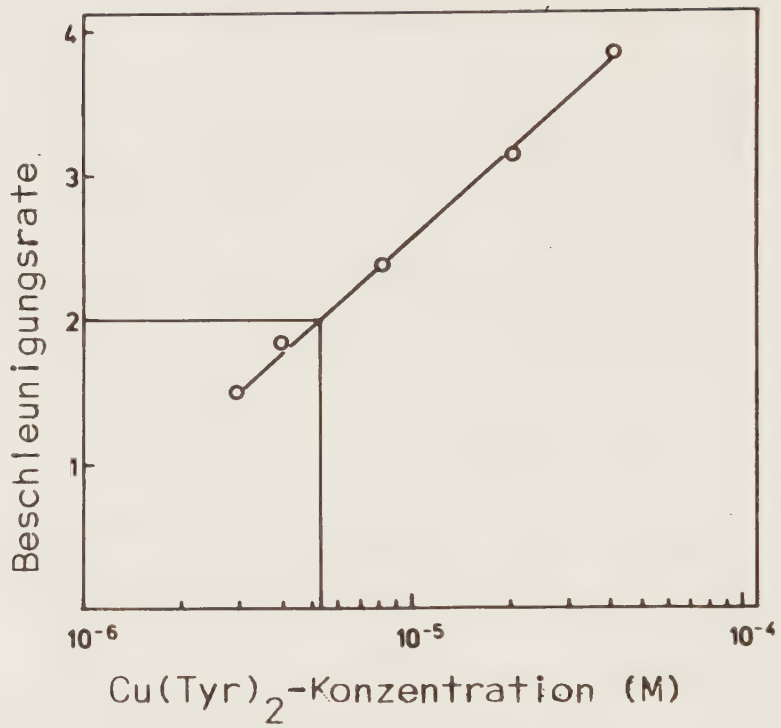


Abb. 1: Beschleunigung der Adrenochrombildung durch $Cu(Tyr)_2$ als Funktion des Logarithmus der Cu^{2+}-Konzentration. Der Bestimmungsansatz enthielt 0,1 M Glycinpuffer, pH 10,0, Adrenalin, $5{,}7 \cdot 10^{-4}$ M und $Cu(Tyr)_2$ in einem Gesamtvolumen von 700 µl. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Adrenalins gestartet, dann wurde die Adrenochrombildung bei 480 nm spektralphotometrisch verfolgt. Die Autoxidationsrate in Abwesenheit des Chelats wurde als 1 definiert.

dungsrate des Adrenochroms verdoppelt. Sowohl für die Autoxidation (Tabelle 4) als auch für die enzymatische Oxidation von Adrenalin (Tabelle 5) lagen diese Konzentrationen im mikromolaren Bereich. Cuprein hingegen hemmte beide Reaktionen zu 50 % bei Cu-Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-9}$ M.

Auch die durch die Komplexe beschleunigten Reaktionen waren durch 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase hemmbar.

Cu-Chelat	Konzentration an Cu, die die Geschwindigkeit der Adrenochrombildung verdoppelt µM
Cu^{2+}_{aq}	11,2
$Cu(Salicylat)_2$	11,2
$Cu(Lys)_2$	9,6
$Cu(Tyr)_2$	5,3

Tab. 4: Beschleunigender Einfluß verschiedener superoxiddismutativ wirkender Cu-Chelate auf die Adrenalinautoxidation. Experimentelle Einzelheiten sind in der Legende zu Abb. 1 beschrieben.

Cu-Chelat	Cu , bei dem die Bildungsrate des Adrenochroms sich verdoppelt µM
Cu^{2+}_{aq}	17,4
$Cu(Salicylat)_2$	16,0
$Cu(Lys)_2$	10,5
$Cu(Tyr)_2$	8,6

Tab. 5: Beschleunigung der Oxidation von Adrenalin mittels Xanthin und Xanthinoxidase durch niedermolekulare Cu-Komplexe. In 900 µl Testvolumen waren vorhanden: 0,1 M Glycinpuffer, pH 10,0, $1,1 \cdot 10^{-4}$ M Xanthin, $4,45 \cdot 10^{-4}$ M Adrenalin und $1,1 \cdot 10^{-8}$ M Xanthinoxidase. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Xanthinoxidase gestartet und die Adrenochrombildung bei 480 nm gemessen.

Bei der spontanen Dismutation von $^{\cdot}O_2^-$ könnten reaktivere Spezies entstehen. Es wäre möglich, daß diese angeregten Radikale für die Adrenalinoxidation verantwortlich sind, und daß ihre Entstehung nur von nativem Cuprein verhindert wird. Dabei könnte es sich um $^1\Delta_g O_2$ oder um $^{\cdot}OH$-Radikale handeln, die nach dem von Kellogg und Fridovich postulierten Mechanismus (76)

$$^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^- + {}^{\cdot}OH + {}^1O_2$$

gebildet werden sollen.

Diese Möglichkeit wurde überprüft, indem DABCO, ein anerkanntes wasserlösliches Abfangreagens für Singulett-Sauerstoff und t-Butanol, ein $^{\cdot}OH$-Radikalfänger, bei der Adrenalinoxidation in Konzentrationen zwischen 1 und 10 mM eingesetzt wurden. Beide Abfangreagenzien zeigten keinen Einfluß auf die Adrenochrombildung, auch nicht in ^2H_2O. Dieses zeigt, daß höchstwahrscheinlich keine der beiden angeregten Sauerstoffspezies an dieser Reaktion beteiligt ist.

Wurde Katalase (6,2 nM) in Abwesenheit oder in Gegenwart der Cu-Komplexe dem Testansatz beigefügt, so blieb die Autoxidationsrate des Adrenalins unbeeinflußt, die Gesamtmenge des gebildeten Adrenochroms lag jedoch höher. Dies deutete auf eine Hemmung der Adrenalinautoxidation durch akkumuliertes H_2O_2 hin, die durch Katalase überwunden wird. Etwa 0,8 µM H_2O_2 hemmten die Adrenochrombildung in Abwesenheit aller Cu-Komplexe sowie in Gegenwart von Cuprein und $Cu(Tyr)_2$ vollständig. Zugesetzte Katalase erhöhte die 480 nm-Absorption, was darauf hindeutete, daß während der Zersetzung von Wasserstoffperoxid durch das Enzym eine sehr reaktive Spezies, vielleicht ein Katalase-$^{\cdot}O_2^-$-Addukt, entstand, die das Adrenalin schnell oxidierte. Bei dieser Spezies handelte es sich weder um $^1O_2$ noch um $^{\cdot}OH$, da weder DABCO noch t-Butanol (bis zu 10 mM) hemmten, auch nicht in ^2H_2O. Einige der geschilderten Beobachtungen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Zusätze (µM)	Beschleunigungsrate der Adrenochrombildung	Relative Menge des gebildeten Adrenochroms
keine	1,0	1,0
H_2O_2 (78,5)	0,0	0,0
H_2O_2 (78,5) + Katalase (0,0062)	49,2	22,8
$Cu(Tyr)_2$ (20,25)	2,2	1,1
$Cu(Tyr)_2$ (20,25)+ Katalase (0,0062)	2,3	1,4
$Cu(Tyr)_2$ (20,25)+ H_2O_2 (78,5) + Katalase (0,0062)	49,6	23,0

Tab. 6: Effekt von Peroxid und Katalase auf die Adrenalinautoxidation. Die Bedingungen der Bestimmung sind wie für Abb. 1. Die Beschleunigungsrate und die gebildete Menge an Adrenochrom in Abwesenheit aller Zusätze wurde als 1,0 definiert.

Alle diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Hemmung der Adrenalinoxidation durch die Cupreine höchstwahrscheinlich nicht auf das Abfangen von $\cdot O_2^-$ beruht (254). Mit Hilfe von EPR-Messungen konnten Rapp et al. zeigen, daß die Reaktion des nativen Cupreins mit verschiedenen Katecholen eine Änderung der EPR-Parameter des proteingebundenen Kupfers bewirkt, was auf eine Veränderung der Cu(II)-Umgebung schließen läßt (255). Ferner konnten Schubotz und Weser (256) aus chiroptischen Meßdaten zeigen, daß ein ternärer Komplex zwischen Adrenalin, EC und Sauerstoff entsteht, und daß eine Reduktion des Cu(II) zu Cu(I) eintritt (257). Ferner wurde beobachtet, daß 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase die Adrenochrombildung eigentlich nicht hemmt, sondern eher verlangsamt.

Diese Beobachtungen können dahingehend interpretiert werden, daß Cuprein eine radikalische Zwischenstufe, z.B. das Semichinonradikal, stabilisiert. Auch die Hemmwirkung von H_2O_2 kann darauf zurückgeführt werden, daß das Peroxid mit dem Semichinon reagiert unter Rückbildung des Adrenalins, so, daß für die Adrenochrombildung keine Zwischenstufen mehr zur Verfügung stehen:

$$^{\cdot}Sc + H_2O_2 \rightarrow H^+ + Adr. + {}^{\cdot}O_2^-$$

3.2.3. Hydroxylaminoxidation

Mit Hilfe der niedermolekularen Cu-Chelate, die SOD-Aktivität besitzen, sollte die Spezifität dieser Bestimmungsmethode für Superoxid untersucht werden. Die Methode beruht auf der Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit in Gegenwart eines enzymatischen $^{\cdot}O_2^-$-Generators, nämlich das Xanthin-Xanthinoxidase-System. Es konnte gezeigt werden, daß diese Reaktion durch Cuprein und Mn-Superoxiddismutase inhibiert wird (23).

Sowohl 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase als auch die niedermolekularen Chelate waren in der Lage, die Nitritbildung zu unterdrücken. Die Konzentration des gebildeten Nitrits in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Cu-Komplexe wurde kolorimetrisch bestimmt und in Prozent der gebildeten Nitritmenge in Abwesenheit aller Hemmer ausgedrückt. Beim Auftragen dieser Prozentwerte als Funktion des Logarithmus der Cu-Konzentration wurden Geraden erhalten (Abb. 2), die es ermöglichten, die Cu-Konzentrationen, bei denen 50 %ige Hemmung zu beobachten ist, zu bestimmen (Tabelle 7).

Auch hier ist keine eindeutige Spezifität für $^{\cdot}O_2^-$ zu beobachten, obwohl die niedermolekularen Cu-Komplexe hier, wie sonst nur bei der NBT-Reduktion durch KO_2, eine relativ hohe Aktivität aufweisen.

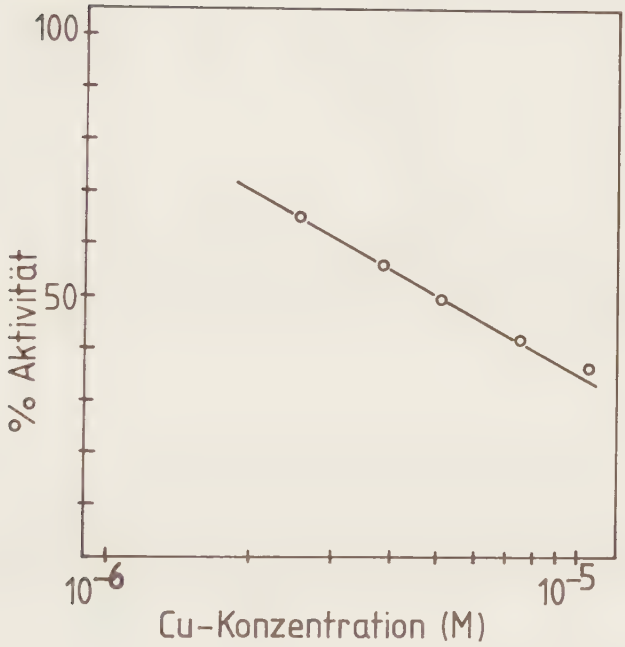


Abb. 2: Prozentuale Hemmung der Nitritbildung aus Hydroxylamin in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von $Cu(Tyr)_2$. Der Inkubationsansatz enthielt in 2 ml: 0,65 M Phosphatpuffer, pH 7,8, Hydroxylammoniumchlorid, 0,5 µM, Xanthin, 0,15 µM, Xanthinoxidase, 0,02 U. Inkubiert wurde 20 Minuten bei 25°C, danach wurden 500 µl des Ansatzes mit je 500 µl einer Sulfanilsäure- (19 mM) und einer α-Naphtylaminlösung (7 mM) versetzt. Nach 20 Minuten wurde die gebildete Menge Nitrit photometrisch bei 530 nm bestimmt.

Cu-Komplex	Cu , bei der 50 %ige Hemmung eintritt (µM)	Verhältnis Cuprein-Cu:Chelat-Cu
Cuprein	0,018	-
$Cu(Lys)_2$	10,50	1 : 583
$Cu(Salicylat)_2$	5,40	1 : 300
$Cu(Tyr)_2$	5,20	1 : 289
$Cu(Acetyl-salicylat)_2$	5,00	1 : 278
$CuSO_4$	4,60	1 : 256

Tab. 7: Cu-Konzentrationen, bei denen eine 50 %ige Hemmung der Hydroxylaminoxidation eintritt. Experimentelles: siehe Legende zu Abb. 2.

3.2.4. Dihydroxyfumaratautoxidation

Bei der Autoxidation von Dihydroxyfumarsäure sollen Superoxidradikale entstehen, die durch die Reaktion mit Nitrotetrazoliumblau sichtbar gemacht wurden. In Gegenwart der superoxiddismutierenden Cu-Chelate allerdings wurde, wie bei der Adrenalinautoxidation, nicht eine Hemmung, sondern eine Beschleunigung beobachtet (Tabelle 8).

Im Gegensatz hierzu zeigte natives Cuprein eine deutliche Hemmung der Reaktion. 50 %ige Hemmung wurde bei einer Konzentration von $4,5 \cdot 10^{-9}$ M EC-Cu beobachtet. Auch die durch die Cu-Komplexe beschleunigte Oxidation der Dihydroxyfumarsäure konnte durch das native Enzym zunächst gehemmt werden. Nach ca. 6 Minuten jedoch wurde dieser Hemmeffekt aufgehoben.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß hier, wie im Falle der Adrenalinoxidation, eine radikalische Zwischen-

Cu-Komplex	Konzentration (M)	Beschleunigungs-rate
$Cu(Tyr)_2$	$2{,}68 \cdot 10^{-4}$	26,3
$Cu(Tyr)_2$	$1{,}34 \cdot 10^{-4}$	10,0
$Cu(Tyr)_2$	$6{,}69 \cdot 10^{-5}$	9,4
$Cu(Tyr)_2$	$8{,}37 \cdot 10^{-6}$	5,0
$Cu(Lys)_2$	$3{,}37 \cdot 10^{-4}$	8,1
$CuSO_4$	$1{,}11 \cdot 10^{-4}$	47,5

Tab. 8: Beschleunigung der Dihydroxyfumaratautoxidation durch Cu-Komplexe. 36 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, 152 µM NBT und 4 mM Dihydroxyfumarsäure waren in einem Gesamtvolumen von 1 ml enthalten. Nach Zugabe des Dihydroxyfumarats in HCl, pH 2, wurde die Formazanbildung bei 540 nm photometrisch verfolgt.

stufe durch Cuprein stabilisiert wird, so daß die weitere Reaktion verlangsamt wird. Die Oxidation in Gegenwart der Cu-Chelate hingegen könnte über einen ganz anderen Mechanismus verlaufen, wobei Cu(II) dem Substrat Elektronen entzieht und so die Bildung der radikalischen Zwischenstufe beschleunigt.

Es kann der Schluß gezogen werden, daß keine der indirekten Bestimmungsmethoden der Superoxiddismutase-Aktivität spezifisch für $^{\cdot}O_2^-$ ist. An allen diesen Reaktionen ist dieses angeregte Sauerstoffradikal mehr oder weniger beteiligt, so daß man durch Anwendung dieser Bestimmungsmethoden allerdings nur ein grobes qualitatives Maß für das Auftreten einer Superoxiddismutase-Aktivität hat.

3.3. Eisen- und Mangankomplexe bei der Dismutation von $^{\cdot}O_2^-$

Mn-Aminosäurekomplexe von Lysin, Tyrosin und Glycin sowie Fe-Chelate mit Glycin, Histidin, Serin und Phenylalanin konnten erhalten werden. Aus den Daten der Elementaranalysen wurde festgestellt, daß erstere von der allgemeinen Zusammensetzung $Mn(Aminosäure)_2$, letztere vom Typ $Fe_3O(Aminosäure)_6(ClO_4)_7 \cdot 3H_2O$ waren.

All diese Komplexe wurden auf ihre Fähigkeit, in indirekten Superoxiddismutase-Tests eine Hemmung hervorzurufen, geprüft. Jedoch war weder bei der Reduktion von Nitrotetrazoliumblau (durch KO_2 oder durch Xanthin und Xanthinoxidase) noch bei der enzymatischen Reduktion von Cytochrom c eine solche Aktivität zu finden. Auch das aus Bakterien isolierte, eisenhaltige Ferrichrom Ferricrocin zeigte keine Superoxiddismutase-Aktivität.

Den endgültigen Beweis lieferte die Pulsradiolyse. Hier konnte festgestellt werden, daß die Reaktion von Fe-Phenylalanin, zum Beispiel, mit $^{\cdot}O_2^-$ fast genauso langsam ist wie die spontane Dismutation von Superoxid (beides bei pH 7,5). Es wurden Reaktionskonstanten zweiter Ordnung von $4{,}3 \cdot 10^6\ M^{-1}s^{-1}$ für die erste und $3{,}7 \cdot 10^6\ M^{-1}s^{-1}$ für die zweite Reaktion ermittelt.

Da jedoch Eisen-ÄDTA- (140,141) und andere Mangan-Komplexe (139) eine SOD-Aktivität besitzen, muß angenommen werden, daß bei den hier untersuchten Komplexen alle Koordinationsstellen abgesättigt waren, so daß Superoxid keinen Zugang zum Metall mehr hatte.

3.4. Reaktive Sauerstoffspzeies und Inflammation

Aktivierte Sauerstoffspezies spielen höchstwahrscheinlich bei inflammatorischen Reaktionen eine entscheidende Rolle. Da die Cu-Komplexe verschiedener antiarthritischer Mittel eine wesentlich höhere antiinflammatorische Aktivität als die Muttersubstanzen aufweisen, sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen dieser erhöhten Wirksamkeit bei der Unterdrückung von Entzündungsreaktionen und einer möglichen Reaktion dieser Komplexe mit den für die Inflammation mitverantwortlichen angeregten Sauerstoffspezies besteht.

3.4.1. Reaktivität von Kupfer-Salicylaten

Salicylatderivate gehören zu den am meisten verwendeten Therapeutika bei Entzündungen. Auch hier zeigten die Cu-Komplexe eine höhere therapeutische Aktivität. Die Cu-Chelate von Salicylat, Acetylsalicylat, p-Aminosalicylat und 3,5-Diisopropylsalicylat wurden in diesem Zusammenhang untersucht.

3.4.1.1. Strukturelles

Die Elementaranalysen waren in Übereinstimmung mit den berechneten Werten für Komplexe der allgemeinen Zusammensetzung $Cu(Ligand)_2$. Die Reinheit der dargestellten Chelate wurde durch Dünnschichtchromatographie gesichert. Von besonderer Bedeutung war der Oxidationszustand und die Koordination des beteiligten Kupfers. Röntgenphotoelektronenspektren der vier zu untersuchenden Komplexe wurden aufgenommen. Neben dem Hauptsignal der Cu $2p_{3/2}$-Elektronen um 934 eV wurden Satelliten bei einer Bindungsenergie um

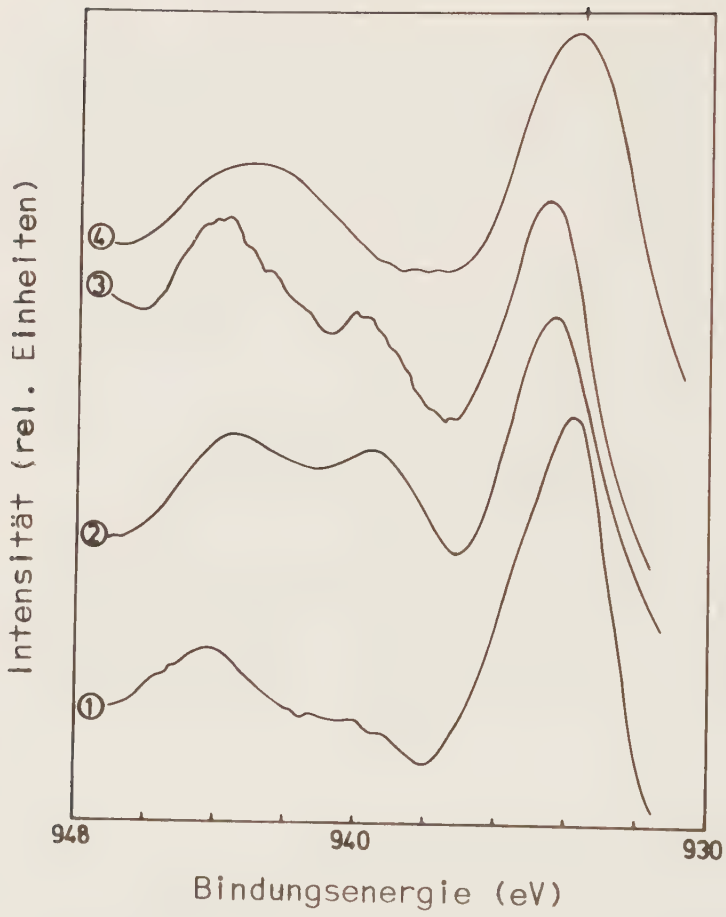


Abb. 3: XPS-Spektren der Cu $2p_{3/2}$ Niveaus von Cu-Salicylaten. Aufnahmebedingungen: "Work function" 6,0 eV;Analysatorenergie 100 eV; Sweep-Breite 20 eV; Sweep-Zeit 20 s; Zahl der Kanäle 200; Druckbereich 1-2 µTorr; Zahl der Scans jeweils 10.
① Cu(II)-Salicylat; ② Cu(II)-Acetylsalicylat; ③ Cu(II)-Diisopropylsalicylat; ④ Cu(II)-p-Aminosalicylat.

943 eV gemessen, die für Cu(II)-Verbindungen charakteristisch sind (221,222). Eine mögliche Photooxidation ursprünglicher Cu(II)-Spezies konnte auf Grund der Stabilität der XPS-Spektren ausgeschlossen werden. In drei Fällen waren die Satelliten aufgespalten, was auf eine Koordination des Kupfers durch doppelgebundenen Sauerstoff hindeutet (222). Im Fall des Cu-p-Aminosalicylats wurde keine Satellitenaufspaltung beobachtet; das könnte entweder daher rühren, daß die Cu-Koordination nicht über doppelgebundenen Sauerstoff stattfindet, oder aber die Aufspaltung konnte nicht aufgelöst werden. Es konnte jedenfalls mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß die untersuchten Verbindungen wohldefinierte Cu(II)-Chelate waren (Abb. 3).

3.4.1.2. Indirekter Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität

Die Fähigkeit der Cu(II)-Komplexe, mit einigen acetylsalicylatähnlichen Therapeutika Reaktionen zu hemmen, die durch Cuprein und/oder SOD-aktive Cu-Aminosäurechelate unterdrückt werden, wurde untersucht (258). Da, wie bereits gezeigt wurde, diese indirekten Bestimmungen der Superoxiddismutase-Aktivität nicht spezifisch für $^{\cdot}O_2^-$ sind, wären Unterschiede im Grad der Hemmung irgendeines der Cu-Chelate in verschiedenen Bestimmungsmethoden nicht überraschend. Jedoch wäre eine signifikante Hemmung immerhin ein grober Beweis für das Vorkommen einer SOD-Aktivität bei den untersuchten Komplexen.

Zunächst wurde die Reduktion von Cytochrom c durch Xanthin und Xanthinoxidase in Gegenwart verschiedener Mengen der Cu(II)-Salicylate sowie in deren Abwesenheit bei 550 nm photometrisch verfolgt. Die Zunahme der Absorption pro Minute (ΔA_{550}/min) wurde in jedem Fall bestimmt. Unter der Annahme, daß ΔA_{550}/min in Abwesenheit der Chelate den Wert

für 100 % Aktivität darstellt, wurden die Aktivitäten in Gegenwart der verschiedenen Cu(II)-Mengen in Prozent dieses Wertes berechnet und gegen den Logarithmus der Kupferkonzentration aufgetragen. Lineare Funktionen konnten so erhalten werden, die eine leichte Bestimmung der jeweiligen Cu(II)-Konzentrationen, die die Cytochrom c-Reduktion zu 50 % hemmt, erlaubten (Tabelle 9, Teil a). Wurde der Absorptionswert bei 550 nm nach sieben Minuten statt ΔA_{550}/min benützt, so ergaben sich ähnliche Verhältnisse (Tabelle 9, Teil b).

Cu(II)-Chelat	Konzentration von Chelat-Cu(II) die eine 50 %ige Hemmung ergibt (µM)	Verhältnis Cuprein-Cu: Chelat-Cu
	T e i l a	
Cuprein	0,002	-
Cu(Diisopropylsalicylat)$_2$	0,860	1 : 430
Cu(Acetylsalicylat)$_2$	6,400	1 : 3200
Cu(p-Aminosalicylat)$_2$	8,600	1 : 4300
Cu(Salicylat)$_2$	10,500	1 : 5250
	T e i l b	
Cuprein	0,0021	-
Cu(Diisopropylsalicylat)$_2$	0,3200	1 : 152
Cu(Acetylsalicylat)$_2$	2,3000	1 : 1095
Cu(p-Aminosalicylat)$_2$	8,2000	1 : 3905
Cu(Salicylat)$_2$	11,2000	1 : 5339

Tab. 9: Hemmung der Cytochrom c-Reduktion durch Cu(III)-Chelate. Der Bestimmungsansatz enthielt in 0,75 ml: 50 mM HEPES-Puffer, pH 7,8; Xanthin, 0,33 mM; Cytochrom c ox., 27 µM; Katalase, 320 U; Xanthinoxidase, 0,02 U. Die zeitabhängige Absorptionszunahme bei 550 nm wurde verfolgt. Teil a: Die Cytochrom c-Reduktionsrate pro Minute wurde bestimmt. Teil b: Der Absorptionswert bei 550 nm nach 7 Minuten wurde als Vergleichsgrundlage benützt.

Cu(II)-Chelat	Cu(II) , die eine 50 %ige Hemmung verursacht (µM)	Verhältnis Cuprein-Cu: Chelat-Cu
T e i l a		
Cuprein	0,04	-
$Cu(Salicylat)_2$	16,00	1 : 400
$Cu(Acetylsalicylat)_2$	23,00	1 : 575
$Cu(p\text{-}Aminosalicylat)_2$	28,00	1 : 700
$Cu(Diisopropyl\text{-}salicylat)_2$	73,00 +)	1 : 1825
T e i l b		
Cuprein	0,04	-
$Cu(Salicylat)_2$	14,80	1 : 370
$Cu(Acetylsalicylat)_2$	20,20	1 : 505
$Cu(p\text{-}Aminosalicylat)_2$	23,00	1 : 575
$Cu(Diisopropyl\text{-}salicylat)_2$	82,00 +)	1 : 2050

Tab. 10: Einfluß der Cu(II)-Salicylate auf die Reduktion des Nitrotetrazoliumblaus durch das Xanthin-Xanthinoxidase-System. In einem Gesamtvolumen von 3 ml waren vorhanden: 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,8; Gelatine, 0,14 mg/ml; Nitrotetrazoliumblauchlorid, 0,342 mg/ml; Xanthin, 0,14 mM; Katalase, 0,2 U/ml und Xanthinoxidase, 16,8 U/ml. Die Absorptionszunahme bei 540 nm wurde gemessen. Die Cu(II)-Chelatkonzentrationen, die die Reaktion zu 50 % hemmen, wurden graphisch ermittelt. Teil a: Die Formazanbildungsrate pro Minute wurde bestimmt. Teil b: Zum Vergleich wurden die maximalen Absorptionswerte bei 540 nm genommen. +) Aufgrund der geringen Löslichkeit mußten diese Werte extrapoliert werden.

Der Einfluß der verschiedenen Cu(II)-Salicylate auf die Nitrotetrazoliumblaureduktion wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden zunächst Xanthin und Xanthinoxidase als Quelle reduzierender Radikale benützt und die Formazanbildung

spektralphotometrisch bei 540 nm verfolgt. Sowohl die Absorptionszunahme pro Minute (ΔA_{540}/min) als auch der maximale Absorptionswert (A_{540}) wurden in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Chelate bestimmt. Die Konzentrationen, die eine 50 %ige Hemmung der Reaktion verursachen, wurden, wie im Fall der Cytochrom c-Reduktion, graphisch ermittelt (Tabelle 10).

Um unkontrollierte Nebenreaktionen der verschiedenen Komponenten des Xanthin-Xanthinoxidase-Systems zu vermeiden, wurde eine gesättigte Kaliumsuperoxidlösung in Dimethylsulfoxid zur Reduktion von NBT verwendet. Hierbei handelte es sich um ein rein anorganisches System, das garantierte, daß die reduzierenden Agenzien nur Superoxid und/oder seine direkten Folgeprodukte waren. Wiederum wurden die Werte für die 50 %ige Hemmung graphisch ermittelt (Tabelle 11).

Cu(II)-Chelat	Konzentration des chelierten Cu(II), die eine 50 %ige Hemmung hervorruft (µM)	Verhältnis Cuprein-Cu: Chelat-Cu
Cuprein	0,06	-
Cu(Salicylat)$_2$	1,30	1 : 22
Cu(Acetylsalicylat)$_2$	2,15	1 : 36
Cu(Diisopropylsalicylat)$_2$	2,85	1 : 48
Cu(p-Aminosalicylat)$_2$	3,00	1 : 50

Tab. 11: Inhibitorische Aktivität von Cu(II)-Salicylaten auf die NBT-Reduktion durch KO_2. Der Bestimmungsansatz enthielt in 3 ml: 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,8; Nitrotetrazoliumblauchlorid, 0,16 mg/ml; Katalase, 0,24 U/ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl gesättigter KO_2-Lösung in DMSO gestartet.

Es zeigte sich, daß in diesem Fall, in dem $^{\cdot}O_2^-$ wahrscheinlich das hauptsächlich für die Reduktion verantwortliche Agens war, die Cu(II)-Chelate die höchste SOD-Aktivität aufwiesen. Die Tatsache, daß die Komplexe bei den verschiedenen Bestimmungsmethoden eine unterschiedliche Aktivität besaßen, stellt nur auf den ersten Blick eine Diskrepanz dar. Diese indirekten Testsysteme sind für $^{\cdot}O_2^-$ nicht spezifisch.

Die Liganden alleine zeigten keinerlei hemmende Wirkung auf irgendeinen der Bestimmungsansätze, auch in einer 10 mal so hohen Konzentration wie die der Cu-Komplexe. Obwohl hydratisierte Cu(II)-Ionen auch SOD-Aktivität besitzen, kann abdissoziiertes Kupfer nicht für die beobachteten Effekte verantwortlich sein, da die Komplexe recht stabil sind (die Stabilitätskonstante von Cu(Salicylat)$_2$ z.B. beträgt 18,5 M^{-1} (259)) und da ferner in den komplexen Systemen, die verwendet wurden, freies Cu^{2+} sofort von den vielen chelierenden Agenzien abgefangen werden würde.

Um die Möglichkeit ausschließen zu können, daß die beobachtete Hemmung auf eine direkte Wirkung der Salicylate auf die Xanthinoxidase beruhten, wurde die vom Enzym katalysierte Oxidation von Xanthin zu Harnstoff in Abwesenheit und in Gegenwart der Cu-Salicylate spektralphotometrisch bei 293 nm verfolgt. Die Bestimmungsansätze enthielten alle Komponenten, die entweder im Cytochrom c-Reduktase- oder im NBT-Reduktionstest enthalten waren. Kein Unterschied konnte festgestellt werden. Die enzymatische Aktivität der Xanthinoxidase wurde also von den Cu-Salicylaten nicht beeinflußt.

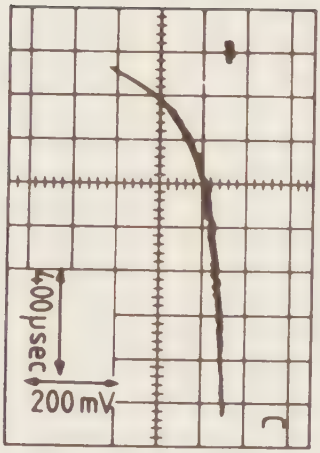
3.4.1.3. Reaktion mit pulsradiolytisch erzeugten Superoxidradikalanionen

Aufgrund der Tatsache, daß die oben erwähnten Bestimmungsmethoden der Superoxiddismutase-Aktivität alle indirekter Natur waren, war es von Interesse, die direkte Reaktion der antiinflammatorisch-wirkenden Cu(II)-Salicylate mit pulsradiolytisch produziertem Superoxid zu untersuchen und die Reaktionskonstanten zu bestimmen (260).

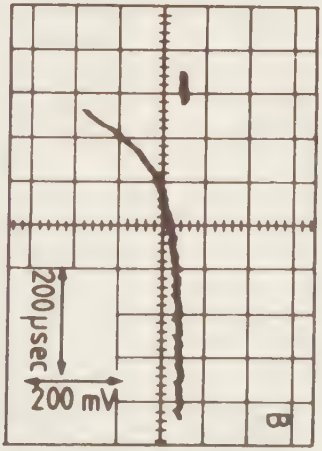
$^{\cdot}O_2^-$ wurde durch 40 ns-Elektronenpulse in sauerstoffgesättigten Lösungen, die 0,1 M Formiat und das jeweils untersuchte Cu-Salicylat enthielten, erzeugt. In Gegenwart von Formiat werden alle $^{\cdot}OH$-Radikale in $^{\cdot}O_2^-$ umgewandelt; damit erhöht sich der G-Wert für Superoxid auf 5,8. Der pH betrug stets 7,5.

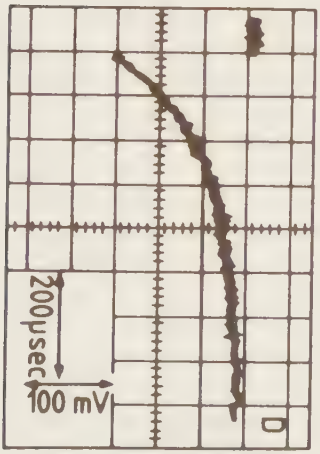
Die Transmissionszunahme verschiedener Konzentrationen von Superoxid in Abwesenheit und in Gegenwart unterschiedlicher Mengen der jeweiligen Kupferchelate wurde mit Hilfe eines Oszilloskops verfolgt. Die Oszilloskopspuren wurden photographiert und zeigten alle Charakteristika von Reaktionen pseudoerster Ordnung (Abb. 4).

Abb. 4: Zerfall pulsradiolytisch erzeugten Superoxids in Gegenwart von Ⓐ $Cu(Salicylat)_2$, 5,0 µM, Ⓑ $Cu(Acetylsalicylat)_2$, 8,4 µM, Ⓒ $Cu(p\text{-}Aminosalicylat)_2$, 5,0 µM, und Ⓓ $Cu(Diisopropylsalicylat)_2$, 2,2 µM. Gemessen wurde die Transmission bei 250 nm. Ein Tectronix 7704 Oszilloskop und eine Polaroidkamera wurden verwendet. Die Messungen wurden in sauerstoffgesättigten Lösungen, die 0,1 M Formiat enthielten, durchgeführt. Der pH wurde auf 7,5 eingestellt. Elektronenpulse von 40 ns Dauer (1,81 MeV) wurden in einer Febetron Pulsradiolyse-Einheit erzeugt. Eine Xenonlampe (Osram XBO 450 W4) diente als Lichtquelle. Der Lichtweg betrug 2 cm.


100 µsec
100 mV
A

400 µsec
200 mV
C

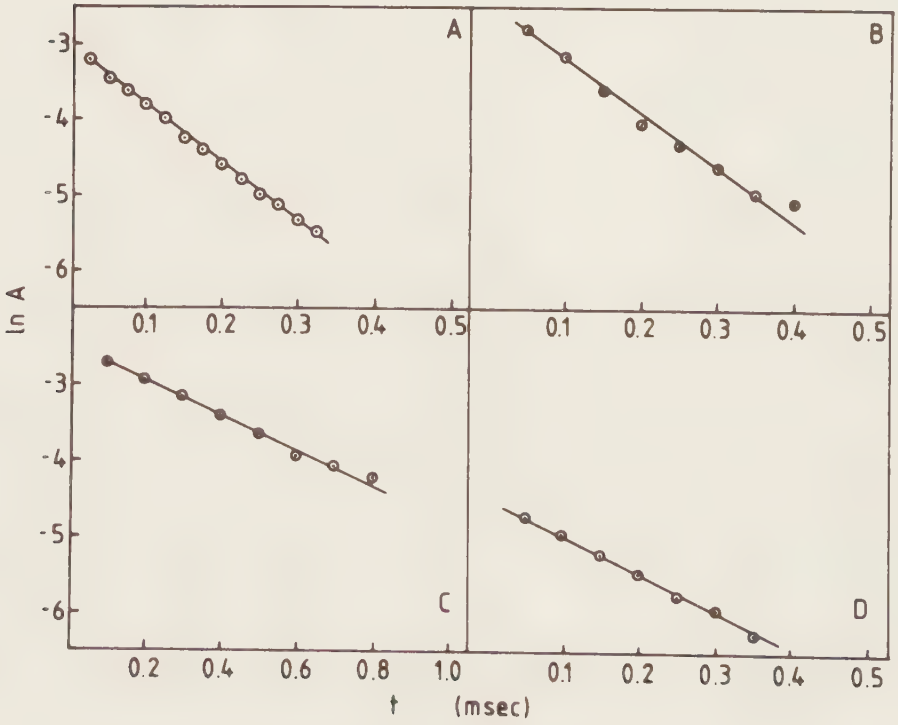

200 µsec
200 mV
B


200 µsec
100 mV
D

Beim Auftragen von ln A_{250}, dem natürlichen Logarithmus der Absorption von $\cdot O_2^-$ bei 250 nm, gegen die Zeit wurden lineare Funktionen erhalten, die die graphische Bestimmung der Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung erhalten (Abb. 5). Im allgemeinen aber wurden diese Werte mit Hilfe eines Wang 2200 Computers direkt berechnet.

Durch Division der Reaktionskonstanten pseudoerster Ordnung durch die eingesetzten Cu(II)-Konzentrationen wurden die jeweiligen Reaktionskonstanten zweiter Ordnung erhalten. Für die vier Cu(II)-Salicylate wurden Werte zwischen 0,79 und 2,40 · 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ erhalten (Tabelle 12). Dies zeigt, daß diese antiinflammatorisch wirksamen Kupferchelate genauso schnell und effektiv mit Superoxid reagieren wie native 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase und andere niedermolekulare Kupferkomplexe (122,125,131,133). Die Reaktionskonstante zweiter Ordnung für die spontane Superoxiddismutation betrug unter den gleichen Reaktionsbedingungen 1,06 · 10^7 $M^{-1}s^{-1}$.

Abb. 5: Graphische Ermittlung der Konstanten pseudoerster Ordnung für die Reaktionen von verschiedenen Cu(II)-Salicylaten mit O_2. Die experimentellen Bedingungen waren dieselben wie für Abb. 4. Ⓐ Cu(Salicylat)$_2$, 5,0 µM; Ⓑ Cu(Acetylsalicylat)$_2$, 8,4 µM; Ⓒ Cu(p-Aminosalicylat)$_2$, 5,0 µM; Ⓓ Cu(Diisopropylsalicylat)$_2$, 2,2 µM.


A
B
C
D
ln A
-3
-4
-5
-6
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.8
1.0
t (msec)

Cu(II)-Chelat	Kupferkonzentration (µM)	$k_{250} \cdot 10^{-9} M^{-1} s^{-1}$ (Mittelwert für alle $^{\cdot}O_2^-$-Konzentrationen)	Mittelwert ($\cdot 10^{-9} M^{-1} s^{-1}$)
Cu(Salicylat)$_2$	1,0	1,50	1,64 ± 0,15
	5,0	1,79	
Cu(Acetylsalicylat)$_2$	1,1	1,21	0,96 ± 0,20
	2,2	0,61	
	8,4	1,07	
Cu(p-Aminosalicylat)$_2$	2,0	1,03	0,79 ± 0,16
	5,0	0,65	
	10,0	0,69	
Cu-(Diisopropylsalicylat)$_2$	2,2	2,28	2,40 ± 0,12
	5,4	2,52	

Tab. 12: Berechnete Reaktionskonstanten zweiter Ordnung für die Reaktion von Superoxid mit vier antiinflammatorisch wirksamen Cu-Komplexen. Mittelwerte für verschiedene $^{\cdot}O_2^-$-Konzentrationen (4 - 36 µM) sind angegeben. Für experimentelle Einzelheiten siehe die Legende zu Abb. 4.

3.4.2. Das Penicillamin-Kupfer-Cluster

Der Kupferkomplex von D-Penicillamin (β,β-Dimethylcystein) ist in vielerlei Hinsicht von besonderer Bedeutung. Zunächst einmal bindet Penicillamin Cu in vivo, was sich in der Tatsache, daß bei Gaben dieser Substanz Kupfer daran komplexgebunden ausgeschieden wird, ausdrückt (261). Der Mechanismus der Cu-Bindung ist eingehend untersucht und eine "reduktive Chelierung" vorgeschlagen worden (262). Das Chelat sollte als Cu(I)- oder als Cu(I)/Cu(II)-"mixed valence"-Komplex ausgeschieden werden.

Ausgehend von den Röntgenstrukturanalyse-Daten wurde aufgrund der Ligandengeometrie vorgeschlagen, daß im $[Cu_{14}$-(D-Penicillamin)$_{12}Cl]^{5-}$-Cluster 6 der Cu-Ionen als Cu(II), die restlichen acht als Cu(I) vorliegen (263,264). Röntgenphotoelektronenspektroskopische Messungen ergaben jedoch, daß alle Cu-Ionen sich in der $3d^{10}$-Form, d.h. als Cu(I), befinden (221,223,224). Das Kupfer wird dabei durch ein Elektronentransfer von einer RS^--Gruppe reduziert; das so entstandene RS·-Radikal wird durch Cu(I) stabilisiert. Der Vorschlag, daß RS·Cu(I)-Spezies stabil sind, kam von Graf und Fallab (265) und wurde später für den rotvioletten Cu-D-Penicillamin-Komplex vorgeschlagen (266).

Andererseits aber zeigte dieser Komplex eine hohe antiinflammatorische Aktivität während D-Penicillamin selber, in der gleichen Konzentration appliziert, noch gar keine solche Aktivität aufwies (174). Es war daher von großem Interesse, die Superoxiddismutase-Aktivität dieses Chelats zu untersuchen.

3.4.2.1. Superoxiddismutase-Aktivität von Cu-Penicillamin

Anhand von indirekten Bestimmungsmethoden wurde die Superoxiddismutase-Aktivität von Cu-Penicillamin getestet (267). Der Cluster war in der Lage, die Nitrotetrazoliumblaureduktion, sowohl auf enzymatischem (Tabelle 13) als auch auf rein anorganischem Weg (Tabelle 14), effektiv zu hemmen. Die Konzentration des gebundenen Kupfers, die gebraucht wurde, um eine 50 %ige Hemmung der Formazanbildung zu erzeugen, lag wesentlich niedriger als die Cu(II)-Konzentrationen anderer SOD-aktiver Cu-Chelate, die den gleichen Hemmgrad bewirkten (21).

Kupferchelat	Vergleichsbasis	Cu-Konzentr. bei 50 %iger Hemmung (µM)	Verhältnis Cu^{2+} (Cuprein): Cu(I)·SR (Chelat)
2Cu,2Zn-SOD	$\Delta A_{540}/min$	0,04	-
Cu-D-Penicillamin		4,30	1 : 107,5
2Cu,2Zn-SOD	$(A_{540})_{max}$	0,04	-
Cu-D-Penicillamin		3,00	1 : 75,0

Tab. 13: Hemmeffekt von Cu-Penicillamin auf die Reduktion von Nitrotetrazoliumblau durch Xanthin und Xanthinoxidase. Experimentelle Einzelheiten siehe Legende zu Tabelle 10.

Cu-Komplex	Cu-Konzentration bei 50 %iger Hemmung (µM)	Verhältnis Cu^{2+} (Cuprein): Cu(I)·SR (Chelat)
2Cu,2Zn-Superoxiddismutase	0,06	-
Cu-D-Penicillamin	10,00	1 : 166,7

Tab. 14: Hemmung der KO_2-induzierten Formazanbildung durch Cu-Penicillamin. Vgl. Tabelle 11 für experimentelle Einzelheiten.

Im Cytochrom-c-Reduktase Test hingegen wurden höhere Konzentrationen des komplexgebundenen Kupfers gebraucht, um einen ähnlichen Hemmeffekt zu zeigen wie die anderen niedermolekularen SOD-Modellkomplexe (Tabelle 15).

Cu-Penicillamin-Konzentration (M Cu)	ΔA_{550}/min	% Hemmung
0,00	0,0280	0,0
$7,56 \cdot 10^{-5}$	0,0200	28,6
$1,11 \cdot 10^{-4}$	0,0167	40,4
$2,23 \cdot 10^{-4}$	0,0117	58,3
$4,45 \cdot 10^{-4}$	0,0067	76,1
$8,90 \cdot 10^{-4}$	0,0000	100,0

Tab. 15: Der Cytochrom c-Reduktase-Test der Superoxiddismutase-Aktivität von Cu-Penicillamin. Die experimentellen Einzelheiten sind die gleichen wie für Tabelle 9.

D-Penicillamin zeigte selber keinen der inhibitorischen Effekte, die sein Cu-Komplex aufwies, auch nicht in Konzentrationen, die um zwei Größenordnungen höher lagen. Das Cu-Chelat hatte keinen Einfluß auf die Oxidation des Xanthins zu Urat, was zeigt, daß die enzymatische Aktivität der Xanthinoxidase unbeeinflußt blieb.

3.4.2.2. Pulsradiolyse

Es lag auf der Hand, die direkte Reaktion des $[Cu_{14}(\text{D-Penicillamin})_{12}Cl]^{5-}$-Clusters mit pulsradiolytisch erzeugtem, reinem $\cdot O_2^-$ zu untersuchen (268). Superoxid wurde in sauerstoffgesättigter wässriger Lösung, die 0,1 M Formiat enthielt, produziert. Die berechneten Reaktionskonstanten zweiter Ordnung waren relativ hoch, zeigten jedoch eine Konzentrationsabhängigkeit (Tabelle 16). Bei höherer Konzentration sank die Reaktivität des Komplexes, was darauf hindeutet, daß zunächst eine Aggregation stattfindet und daß nicht alle Cu(I)·SR-Spezies für die Reaktion mit $\cdot O_2^-$ zur Verfügung stehen.

Kupferkomplex	Konzentration (µM)	$K_{250} \cdot 10^{-9}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
2Cu,2Zn-Superoxid-dismutase	1,0 - 5,0	1,30 ± 0,10 (pro Untereinheit)
Cu-D-Penicillamin	0,48	0,70 ± 0,05
Cu-D-Penicillamin	9,10	0,45 ± 0,06

Tab. 16: Berechnete Reaktionskonstanten zweiter Ordnung für die Reaktion von $^{\cdot}O_2^-$ mit Cu-Penicillamin. Mittelwerte für verschiedene Superoxidkonzentrationen sind angegeben. Experimentelle Daten sind in der Legende zu Abb. 4 angegeben.

Penicillamin selber zeigte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine Beschleunigung der spontanen Disproportionierung von Superoxid. Diese betrug beim pH-Wert dieser Messungen (pH 7,0) $1,78 \cdot 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$.

3.4.2.3. Reaktivität der Inhibitoren ÄDTA und KCN

Wenn es sich bei dem an der Reaktion mit $^{\cdot}O_2^-$ möglicherweise beteiligten Kupfer tatsächlich um Cu(I) handeln sollte, so sollten Komplexbildner, die Cu(II) chelieren, so ÄDTA und vor allem CN^-, keinen Einfluß auf die Reaktion von Cu-Penicillamin mit Superoxid zeigen.

Bei Zugabe von Äthylendiamintetraessigsäure zu einer $9,1 \cdot 10^{-6}$ M Cu-D-Penicillamin-Lösung war eine Abhängigkeit der Reaktionsrate des Cu-Komplexes mit $^{\cdot}O_2^-$ von der ÄDTA-Konzentration zu beobachten (Abbildung 6). Bei einer Konzentration von 10^{-8} M wurde die Reaktionskonstante zweiter Ordnung nicht beeinflußt ($k = 4,55 \pm 0,70 \cdot 10^8$ $M^{-1}s^{-1}$). Bei einer 10^{-7} M Konzentration an ÄDTA erhöhte sich k ($6,60 \pm 1,37 \cdot 10^8$ $M^{-1}s^{-1}$) leicht, um bei noch höheren

ÄDTA-Konzentrationen erneut leicht abzufallen, was allerdings einem vergleichbaren Abfall der Reaktionsrate der spontanen Dismutation in Gegenwart steigender Mengen des Chelatbildners entsprach (10^{-6} M ÄDTA: $k = 4{,}86 \pm 0{,}97 \cdot 10^8\ M^{-1}s^{-1}$; 10^{-5} M ÄDTA: $k = 1{,}21 \pm 0{,}12 \cdot 10^8\ M^{-1}s^{-1}$). Dies kann durch eine kompetitive Chelierung des Kupfers in der äußeren Sphäre des Cu-Penicillamin-Komplexes erklärt werden, wobei die Zugänglichkeit der ÄDTA-resistenten Cu-Spezies im Inneren des Clusters für $^{\cdot}O_2^-$ erhöht wird (268).

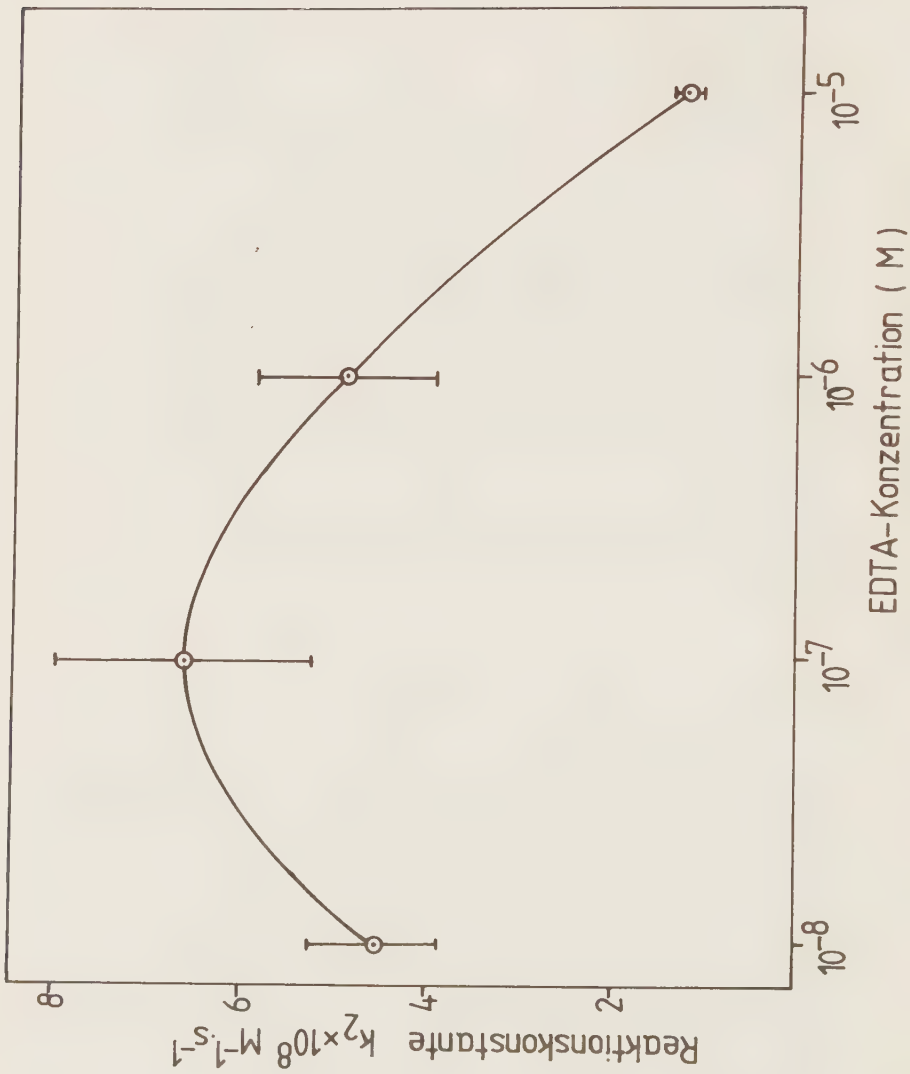
Der Einfluß von 10^{-4} M KCN auf die Hemmung der KO_2-induzierten Nitrotetrazoliumblau-Reduktion durch Cu-D-Penicillamin wurde untersucht. Dabei ergab sich praktisch kein Unterschied in der zur Erzeugung einer 50 %igen Hemmung benötigten Cu(I)·SR-Konzentration. Sie betrug in Abwesenheit von CN^- $5{,}2 \cdot 10^{-5}$ M und in Gegenwart von 10^{-4} M KCN $4{,}0 \cdot 10^{-5}$ M.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß kein Cu(II) an der Reaktion des Chelats mit $^{\cdot}O_2^-$ beteiligt ist.

3.4.2.4. Strukturelle Untersuchungen

Von besonderem Interesse war, ob die elektronischen Absorptionseigenschaften von Cu-Penicillamin in Gegenwart von anorganischem $^{\cdot}O_2^-$ beeinflußt werden. Sowohl äquimolare Mengen von KO_2 in DMSO (ges.) als auch Zugaben von KO_2 im Überschuß zu wässrigen Lösungen des Cu-Chelats bewirkten keine Änderung des Absorptionsspektrums zwischen 350 und 750 nm. Dieses deutet auf eine tatsächliche Beschleunigung der spontanen Dismutation von Superoxid hin und schließt die Möglichkeit einer Reaktion in einer Richtung aus.

Mit Hilfe der Röntgenphotoelektronenspektrometrie wurde der Oxidationszustand des Kupfers und des Schwefels vor und


Reaktionskonstante $k_2 \times 10^8$ $M^{-1}.s^{-1}$
8
6
4
2
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
10^{-5}
EDTA-Konzentration (M)

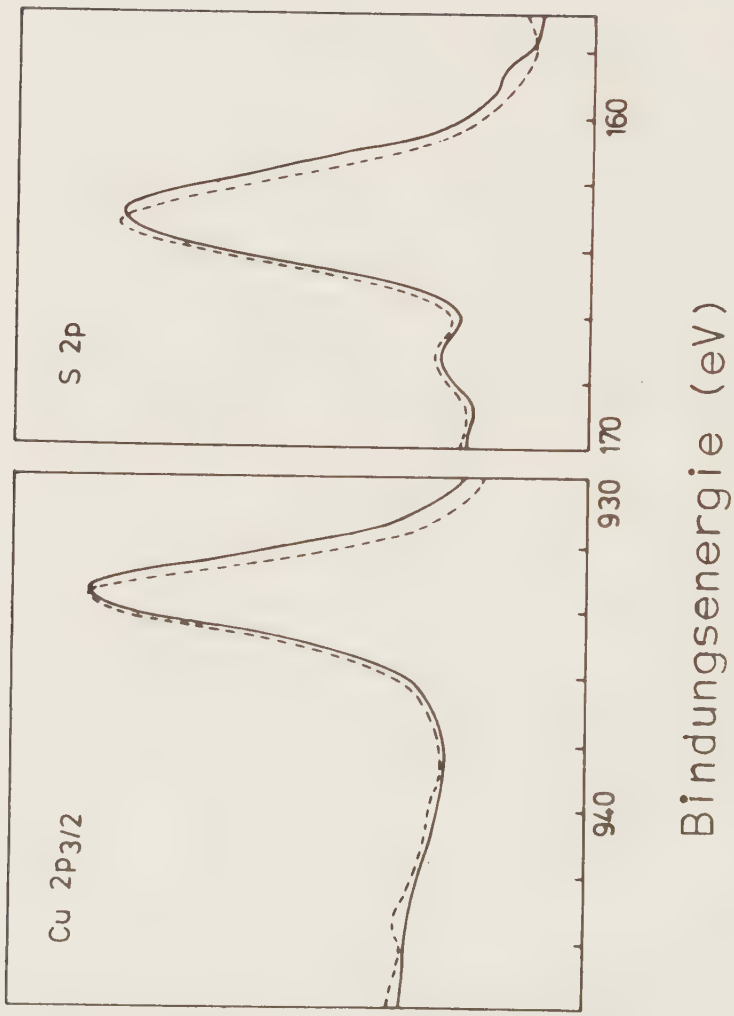
nach der Reaktion mit $^{\cdot}O_2^-$ bestimmt. Im letzteren Fall wurde ein Überschuß an festem KO_2 mit einer konzentrierten Lösung von Cu-Penicillamin umgesetzt. Katalase wurde zugegeben, um Nebenreaktionen des Cu-Chelats mit H_2O_2 zu vermeiden, die möglicherweise zur Bildung von $^{\cdot}OH$ und anderen angeregten Sauerstoffspezies führen könnte. In beiden Fällen blieb das Kupfer in der Oxidationsstufe +1 ($3\,d^{10}$), was aus der Bindungsenergie der Cu $2p_{3/2}$-Elektronen (933,4 ± 0,3 eV) und aus der Tatsache, daß keine für Cu(II) charakteristischen Satelliten zu sehen waren, geschlossen werden konnte. Photoreduktion einer ursprünglichen Cu(II)-Spezies konnte aufgrund der Stabilität der Spektren ausgeschlossen werden. Die Bindungsenergie der 2p-Elektronen des Schwefels lag etwas höher als 163 eV, was auf eine Thiolatspezies (oder ein RS$^{\cdot}$-Radikal) hindeutet. Kein Unterschied im Oxidationszustand sowohl des Kupfers als auch des Schwefels war also nach der Reaktion mit KO_2 zu beobachten (Abb. 7).

Aus der Tatsache, daß die XPS-Spektren von Cu und S nach der Reaktion mit $^{\cdot}O_2^-$ unbeeinflußt bleiben, wobei Kupfer als Cu(I) erhalten blieb, sowie aufgrund der Beobachtung, daß chelierende Agenzien, die mit Cu(II) spezifisch reagieren, die Reaktivität des Cu-Penicillamin-Chelats mit $^{\cdot}O_2^-$ nicht hemmen konnten, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich bei der Spezies, die mit Superoxid reagiert und am Oxidations-Reduktions-Zyklus beteiligt ist, um ein Schwefelradikal handelt, das durch Cu(I) stabilisiert wird:

$$\text{Cu(I)}^{\cdot}\text{SR} + {}^{\cdot}O_2^- \longrightarrow \text{Cu(I)}^{-}\text{SR} + O_2$$

$$\text{Cu(I)}^{-}\text{SR} + {}^{\cdot}O_2^- \longrightarrow \text{Cu(I)}^{\cdot}\text{SR} + O_2^{2-}$$

Abb. 6: Abhängigkeit der Reaktionskonstante zweiter Ordnung für die Reaktion von Cu-D-Penicillamin mit pulsradiolytisch erzeugten Superoxidionen von der Konzentration an zugegebenem ÄDTA. Die Konzentrationen des Cu-Chelats betrug 9,1 µM. Experimentelle Einzelheiten sind wie bei Abb. 4.


Cu 2P3/2
940
930
S 2p
170
160
Bindungsenergie (eV)

3.4.3. Zur SOD-Aktivität antiinflammatorischer Goldkomplexe

Verschiedene Gold(I)-Komplexe besitzen eine antiinflammatorische Wirkung und werden in der Therapie der inflammatorischen Arthritis eingesetzt. Eine besondere Bedeutung spielen dabei die Au(I)-Komplexe von Thiomalat und Thioglucose. Über den Wirkungsmechanismus ist wenig bekannt; es wird aber angenommen, daß die lysosomalen Enzyme der phagozytierenden Zellen gehemmt werden, was in vitro für einige Enzyme (z.B. Alkoholdehydrogenase, Carboanhydrase) gezeigt werden konnte. Andere Theorien über die Wirkung der Au(I)-Chelate besagen, daß diese die Gelenkstruktur durch Kollagenstabilisierung (über sogenannte "cross-links") befestigen, daß die Immunreaktionen beeinflußt werden oder daß die Chelate die Prostaglandinbiosynthese und somit die inflammatorischen Reaktionen beeinflussen. Fest steht, daß Au(I) in die Zellen hineingelangt und daß es in den Lysosomen der Makrophagen zu finden ist. In Lösung ist Au(I) instabil und muß daher durch Mercaptide stabilisiert werden (269).

Es war von Interesse zu untersuchen, ob Au(I)-Thiomalat und Au(I)-Thioglucose, wie die antiinflammatorisch wirkenden Cu-Komplexe,eine Superoxiddismutase-Aktivität besitzen. Zum Vergleich sollten die äquivalenten Cu-Chelate

---

Abb. 7: XPS-Spektren der Cu $2p_{3/2}$- und der S 2p-Niveaus von Cu-Penicillamin. Die Meßbedingungen waren die gleichen wie in der Legende zu Abb. 3.
——: Unbehandelte Probe; ---: Cu-Penicillamin + ein Überschuß an festem KO_2 in Gegenwart von 500 U Katalase. Der S 2p-Satellit bei 168 eV ist auf eine Verunreinigung mit anorganischem Sulfat zurückzuführen und blieb nach der Reaktion mit Superoxid unbeeinflußt.

ebenfalls getestet werden. Sowohl bei der NBT-Reduktion (Tabelle 17) als auch bei dem Cytochrom c-Reduktase-Test (Tabelle 18) waren die Goldkomplexe ohne Wirkung. Die entsprechenden Kupferkomplexe hingegen, die mit Hilfe der Röntgenphotoelektronenspektrometrie als Cu(I)-Verbindungen identifiziert werden konnten, besaßen eine ausgeprägte SOD-Aktivität. Die Liganden bewirkten ebenfalls keinerlei Hemmung.

Komplex	O_2^--Quelle	Konzentration bei 50 %iger Hemmung (µM)	Verhältnis Cuprein-Cu: Chelat-Cu
Cu-Thiomalat	KO_2	49	1 : 817
Cu-Thioglucose		27	1 : 450
Cu-Thiomalat	Xanthin/	58	1 : 1450
Cu-Thioglucose	Xanthin-oxidase	65	1 : 1625

Tab. 17: Hemmung der Formazanbildung durch Cu-Thiomalat und Cu-Thioglucose. Die entsprechenden Au(I)-Chelate waren inaktiv. Experimentelles: für das KO_2-System vgl. Tabelle 11, für das Xanthin-Xanthinoxidase-System Tabelle 10 (hierbei wurden die ΔA_{540}/min-Werte als Vergleichsbasis genommen).

Chelat	Konzentration bei 50 %iger Hemmung (µM)	Verhältnis Cuprein-Cu: Chelat-Cu
Cu-Thiomalat	1,50	1 : 750
Cu-Thioglucose	1,45	1 : 725

Tab. 18: Hemmung der Cytochrom c-Reduktion durch Cu-Komplexe von Thiomalat und Thioglucose. ΔA_{550}/min diente als Vergleichsgröße. Die experimentellen Einzelheiten sind in der Legende zu Tabelle 9 angegeben.

Die Cu-Chelate zeigten also eine ausgeprägte SOD-Aktivität, was sich ganz besonders in der recht guten Hemmung der Cytochrom c-Reduktion widerspiegelt. Da die entsprechenden Au(I)-Komplexe keinerlei Hemmeffekt aufwiesen, besteht die Möglichkeit, daß in der Zelle Au(I) gegen Cu ausgetauscht wird, wobei das freigesetzte Au(I) bestimmte Enzyme der Makrophagen hemmt, während die korrespondierenden Kupferchelate die angeregten Sauerstoffspezies abfangen. Es könnte aber auch sein, daß die antiinflammatorische Wirkung der Au-Chelate auf einem ganz anderen Wirkungsmechanismus beruht und daß keine direkte Reaktion mit den für die Entzündungsreaktionen mitverantwortlichen Sauerstoffradikalen eintritt.

3.4.4. Superoxiddismutase-aktive Cu-Salicylate als $^{\cdot}O_2^-$-Indikatoren während mikrosomaler Hydroxylierungen

Wenn die antiinflammatorisch-aktiven Cu-Chelate im zellulären Bereich angeregte Sauerstoffspezies abfangen sollen, dann müßten sie auch in komplexen biochemischen Systemen ihre Superoxiddismutase Aktivität zum Vorschein bringen können. Ein solches komplexes System ist das der mischfunktionellen Oxidase (Cytochrom P-450). Hier konnte mit Hilfe von $Cu(Tyr)_2$ gezeigt werden, daß $^{\cdot}O_2^-$ an Hydroxylierungs- und Dealkylierungsreaktionen beteiligt ist (147-150). Die Fähigkeit verschiedener Cu(II)-Salicylate, die Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin und die Hydroxylierung von Benzo-[α]-pyren durch induzierte Lebermikrosomen zu hemmen, wurde getestet (258).

$Cu(Acetylsalicylat)_2$ wies eine effektive und signifikante Hemmung der Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin auf (Abb. 8). In einer Konzentration von 80 µM war die Aktivität auf 30 % gesunken. In der gleichen Konzentration bewirkte $Cu(Salicylat)_2$ eine 30 %ige, $Cu(p\text{-}Aminosalicylat)_2$ und

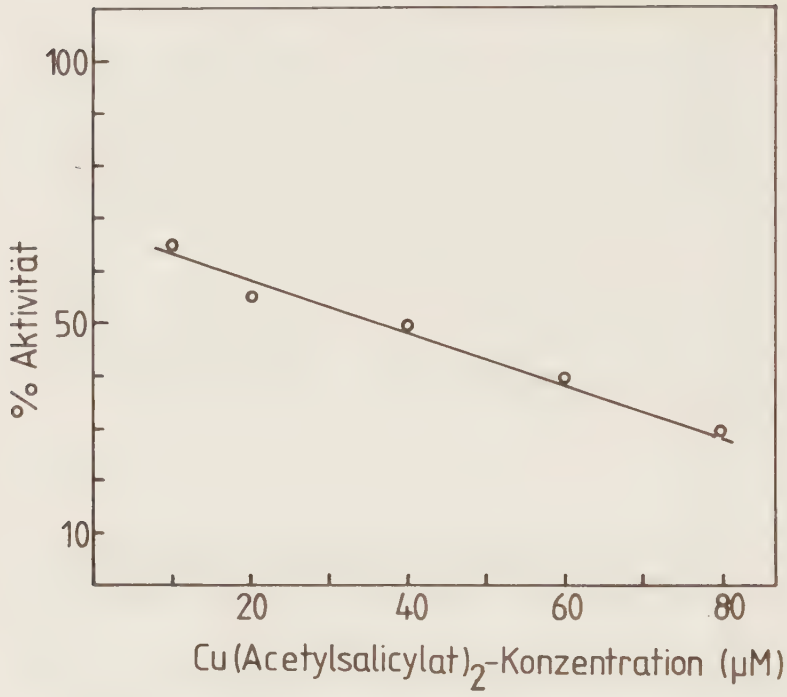


Abb. 8: Hemmung der Deäthylierung von 7-Äthoxycoumarin durch Cu(Acetylsalicylat)$_2$. 0,5 mg mikrosomales Protein aus Phenobarbital-induzierten Rattenlebermikrosomen wurden in 50 mM Tris.HCl-Puffer, pH 7,5, zusammen mit 150 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Nikotinamid, 7 mM Isocitrat, 0,4 U Isocitratdehydrogenase und 100 mM 7-Äthoxycoumarin bei 22°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet. Der Wert für 100 % Aktivität (in Abwesenheit der Cu-Salicylate) betrug 1,1 nMol dealkyliertes Äthoxycoumarin/min/mg Protein.

Cu(Diisopropylsalicylat)$_2$ jeweils eine 25 %ige Hemmung der Reaktion.

Alle vier Cu-Salicylate hemmten die Hydroxylierung von Benzo-[α]-pyren (Tabelle 19). Hierbei zeigte Cu(Acetylsalicylat)$_2$ wiederum den größten Hemmeffekt.

Cu(II)-Chelat	Metabolisierte Benzo-[α]-pyren-Menge (nMol/min/mg Protein)	% Hemmung
keiner	0,500	0
$Cu(Acetylsalicylat)_2$	0,085	83
$Cu(Diisopropylsalicylat)_2$	0,330	34
$Cu(Salicylat)_2$	0,370	26
$Cu(p\text{-}Aminosalicylat)_2$	0,375	25

Tab. 19: Hemmeffekt von Cu-Salicylaten auf die Hydroxylierung von Benzo-[α]-pyren. 1 mg mikrosomales Protein aus Methylcholanthren-induzierten Rattenlebermikrosomen wurde in der gleichen Mischung wie für Abb. 8 angegeben inkubiert, wobei statt 7-Äthoxycoumarin [^{3}H]-Benzo-[α]-pyren in einer Konzentration von 80 µM vorhanden war. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Durch Zugabe von 1 mM NADPH wurde die Reaktion gestartet und nach 10 Minuten gestoppt. Die Konzentration der Cu-Chelate betrug stets 30 µM.

Die Cu-Salicylat-Komplexe reagieren demnach auch auf zellulärer Ebene mit Superoxidradikalen, was darauf hindeutet, daß sie im Körper durchaus in der Lage sind, auf diesem Weg ihre therapeutische Wirkung zu entfalten.

3.4.5. Hemmung des Prostaglandin-Synthetase-Komplexes in vitro durch die SOD-aktiven, antiinflammatorisch wirksamen Cu-Komplexe

Da die Prostaglandine höchstwahrscheinlich eine Rolle bei den Entzündungsreaktionen spielen und ihre Biosynthese durch viele antiinflammatorische Mittel unterdrückt wird, war es von besonderem Interesse, den Einfluß der Cu-Salicylate und des Cu-Penicillamins auf die Prostaglandin-Syn-

thetase zu messen und mit dem der Liganden zu vergleichen (268).

Die Bildung von Prostaglandinen aus [^{14}C]-Arachidonsäure durch Mikrosomen aus Stier-Samenbläschen wurde gemessen (Tabelle 20). Die Endkonzentration der Hemmer betrug jeweils 100 µM. Es ist zu beachten, daß eine Hemmung oder eine Aktivierung um 10 % als nicht signifikant zu betrachten ist. Auch das SOD-aktive $Cu(Tyr)_2$ vermochte die Aktivität des Enzymkomplexes zu verringern.

Zusatz	% Hemmung
$Cu(Salicylat)_2$	24
Na-Salicylat	6
$Cu-(Acetylsalicylat)_2$	17
Acetylsalicylsäure	10
$Cu(p-Aminosalicylat)_2$	32
Na-p-Aminosalicylat	17
$Cu(Diisopropylsalicylat)_2$	10
Na-Diisopropylsalicylat	10
$Cu(Tyr)_2$	17
L-Tyrosin	9
$Cu(Lys)_2$	- 9
L-Lysin	-19
Cu-D-Penicillamin	61
D-Penicillamin	-14

Tab. 20: Einfluß der SOD- und antiinflammatorisch-aktiven Cu-Chelate und ihrer Liganden auf die Prostaglandin-Biosynthese. Mikrosomen aus Stier-Samenbläschen wurden in einer Endkonzentration von 0,3 mg Protein in 100 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die Inhibitorkonzentration betrug jeweils 100 µM. Nach Zugabe von [^{14}C]-Arachidonsäure (Endkonzentration 9 µM, das entspricht $1{,}1 \cdot 10^6$ cpm) wurde die Mischung 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 5 µl nicht-markierter Prostaglandinlösung (0,2 mg/ml in Abs. Äthanol) als Trägersubstanz zugegeben. Nach säulenchromatographischer Auftrennung (Bio-Sil) wurde die Produktbildung im Szintillationsspektrometer bestimmt. 100 % Aktivität entsprach einer Zählrate von 24 000 cpm.

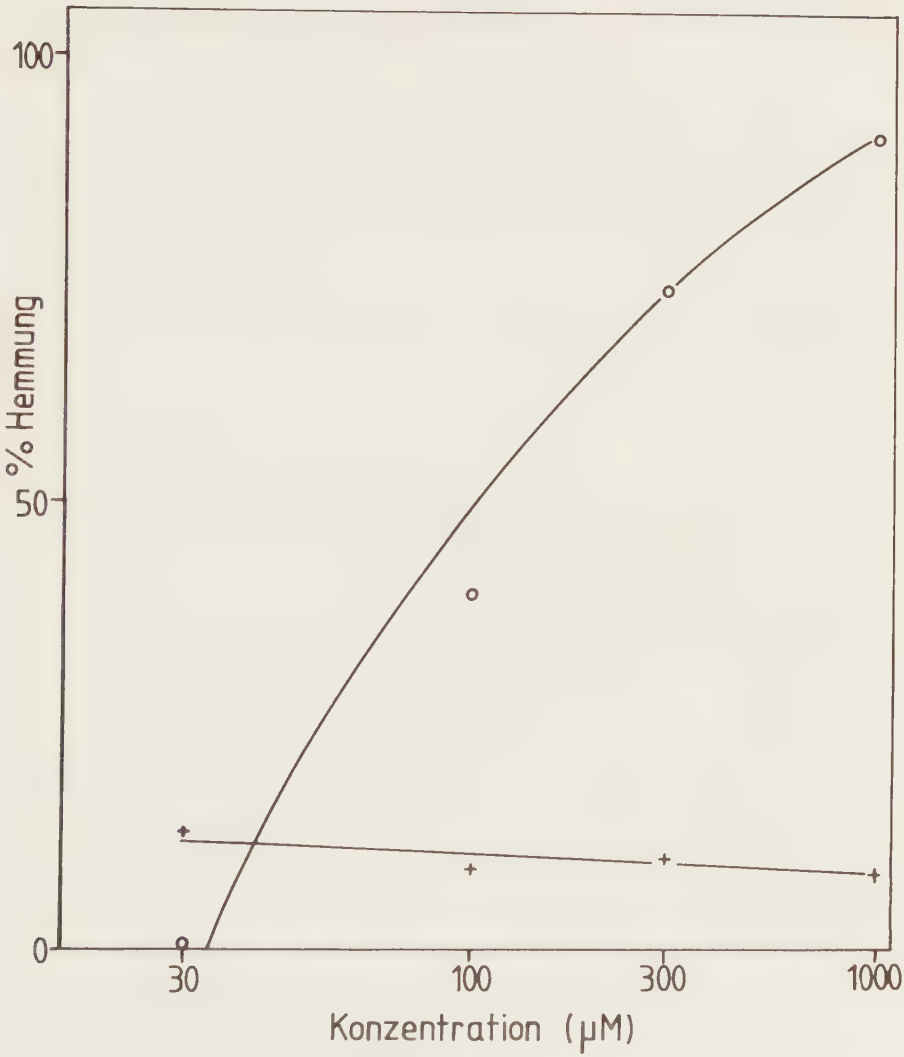


Abb. 9: Einfluß von Cu-D-Penicillamin (-o-o-o-) und D-Penicillamin (-+-+-+-) auf die Prostaglandinbiosynthese-Reaktion als Funktion der Konzentration. Die experimentelle Prozedur ist in der Legende zu Tabelle 20 beschrieben.

Da sich Cu-D-Penicillamin als der effektivste Hemmer der PG-Biosynthese erwies, wurde seine Hemmwirkung in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen (Abb. 9). D-Penicillamin selbst blieb inaktiv und zeigte keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit.

Ob die Hemmung der Biosynthese von Prostaglandinen daher rührt, daß die für die Metabolisierung der Arachidonsäure möglicherweise benötigten $^{\cdot}O_2^-$ abgefangen werden, oder ob die Komplexe über einen anderen Hemmungsmechanismus wirken, kann so nicht ermittelt werden.

3.4.6. Oxidativer Abbau der Hyaluronsäure als Modell für die Zerstörung der Synovialflüssigkeit bei inflammatorischer Arthritis

McCord konnte 1974 zeigen, daß sowohl Hyaluronsäure als auch die Gelenkflüssigkeit von Rindern durch Sauerstoffradikale, die bei der Reaktion von Hypoxanthin mit Xanthinoxidase entstehen, abgebaut werden. Aus der Tatsache, daß dieser oxidative Abbau durch Superoxiddismutase, Katalase und Mannit gehemmt wurde, folgerte er, daß $^{\cdot}OH$-Radikale, die über die Reaktion von H_2O_2 mit $^{\cdot}O_2^-$ entstehen sollen, für diese Zerstörung und somit in vivo auch für den entsprechenden Abbau der Gelenkflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis verantwortlich sind. Nachdem von mehreren Autoren diese Haber-Weiß-Reaktion nicht nachgewiesen werden konnte (77,78), revidierte McCord seine Hypothese dahingehend, daß die $^{\cdot}OH$-Radikalbildung über eine Metallkatalyse (vornehmlich Eisen) erst verläuft (270):

$$^{\cdot}O_2^- + Me^{n+} \rightarrow O_2 + Me^{(n-1)+}$$

$$Me^{(n-1)+} + H_2O_2 \rightarrow Me^{n+} + OH^- + {}^{\cdot}OH$$

$$\overline{\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad}$$

$$^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + {}^{\cdot}OH$$

Bei der von ihm untersuchten Reaktion dienten entweder Fe(II)-ÄDTA oder Transferrin als Katalysatoren.

Es war von Interesse, den Abbau der Hyaluronsäure als Modell für die Gelenkflüssigkeit mittels Sauerstoffradikale zu untersuchen, um den Einfluß der antiinflammatorisch- und SOD-aktiven Cu-Komplexe auf dieses System messen zu können.

3.4.6.1. Enzymatische und chemische Systeme

Mehrere enzymatische und chemische Systeme wurden für die Produktion der Sauerstoffradikale sowie für den Nachweis eines möglichen Abbaus der Hyaluronsäure angewandt. Als $\cdot O_2^-$-Quellen (und möglicherweise als direkte bzw. indirekte Quellen weiterer angeregter Sauerstoffspezies) dienten die Systeme Xanthin/Xanthinoxidase, Hypoxanthin/Xanthinoxidase, Acetaldehyd/Xanthinoxidase, Dihydroxyfumarsäure (zugegeben in HCl, pH 2) und Kaliumsuperoxid. Zum Nachweis des von McCord postulierten oxidativen Abbaus der Hyaluronsäure wurde die Viskosität der Lösung im Verlauf der Reaktion gemessen, die Konzentration der Hyaluronsäure mit Hilfe der Trübungsmessung (271) in verschiedenen Zeitabständen bestimmt und die freien (oder möglicherweise freigesetzten) N-Acetylaminozuckerreste kolorimetrisch erfaßt (272). In keinem dieser Systeme, die beliebig miteinander kombiniert wurden, konnte ein Abbau der Hyaluronsäure festgestellt werden, auch nicht in Gegenwart von Fe^{2+}, Fe^{3+} oder Transferrin.

3.4.6.2. Röntgenradiolytisch erzeugte Sauerstoffradikale

Da indirekte Methoden zur Erzeugung der Sauerstoffradikale keinen Nachweis für ihre mögliche Beteiligung am oxidativen Abbau der Hyaluronsäure erbrachten, wurde eine reine Quelle dieser Radikale benützt, und zwar die Röntgenradiolyse. Hierbei wird das Wasser durch Behandeln mit Röntgenstrahlen gespalten. Es entstehen die Primärradikale e^-_{aq}, $^{\cdot}OH$ und $^{\cdot}H$ sowie H_2O_2, H_2, OH^- und H_3O^+. In Gegenwart von O_2 entstehen aus $^{\cdot}H$-Radikalen und e^-_{aq} $HO_2^{\cdot}$ bzw. $^{\cdot}O_2^-$. Da in der Hauptsache $^{\cdot}OH$-Radikale für den oxidativen Abbau verantwortlich sein sollen, auch wenn sie sekundär über $^{\cdot}O_2^-$ und H_2O_2 entstehen, konnte kein Formiat (zur Umwandlung von $^{\cdot}OH$ in $^{\cdot}O_2^-$) eingesetzt werden, da dann auch die sekundären $^{\cdot}OH$-Radikale sofort abgefangen worden wären. Es wurde daher der Effekt von $^{\cdot}OH$-Radikalen (+ e^-_{aq}) in Gegenwart von N_2 und der von einem äquimolaren Gemisch von $^{\cdot}OH$ und $^{\cdot}O_2^-$ (in O_2-begasten Lösungen) auf die Viskosität einer Hyaluronsäurelösung in Abwesenheit und in Gegenwart von Transferrin gemessen (Tabelle 21).

Es ist klar ersichtlich, daß in Gegenwart von O_2, wo außer $^{\cdot}OH$-Radikalen (in der gleichen Konzentration wie in N_2-begasten Lösungen) noch die äquimolare Menge Superoxid vorhanden ist, die Viskosität nicht so stark abnimmt; der oxidative Abbau der Hyaluronsäure ist also im ersten System effektiver. Das bedeutet, daß $^{\cdot}OH$-Radikale durch $^{\cdot}O_2^-$ abgefangen werden, eher als daß zusätzliche Hydroxylradikale über Superoxid entstehen. Eine Katalyse durch Transferrin war nicht ersichtlich. Das bedeutet, daß die Reaktion

$$^{\cdot}OH + {}^{\cdot}O_2^- \rightarrow O_2 + OH^-$$

wesentlich schneller und effektiver abläuft als die Umsetzung:

$$H_2O_2 + {}^{\cdot}O_2^- \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + O_2$$

unabhängig davon, inwieweit diese zweite Reaktion durch Transferrin katalysiert wird.

System	Erzeugte Radikale	$\Delta\eta_{rel}$ (cSt)	% $(\Delta\eta_{rel})_o$
Hyaluronsäure	-	0,3390	100,00
Hyaluronsäure	$^{\cdot}OH$, e^-_{aq}	0,898	26,49
Hyaluronsäure	$^{\cdot}OH$, $^{\cdot}O^-_2$	0,1236	35,96
Hyaluronsäure + Transferrin	-	0,3437	100,00
Hyaluronsäure + Transferrin	$^{\cdot}OH$, e^-_{aq}	0,0919	26,74
Hyaluronsäure + Transferrin	$^{\cdot}OH$, $^{\cdot}O^-_2$	0,1210	35,21

Tab. 21: Abnahme der Viskosität der Hyaluronsäure durch röntgenradiolytisch erzeugte Sauerstoffradikale in einer Konzentration von 5,08 µM/min. Die Bestrahlungszeit betrug 2 Minuten. Die Viskosität wurde mit einem Mikro-KPG-Ubbelohde Viskosimeter bestimmt und um den Viskositätsbetrag des Puffers korrigiert. Die Lösungen enthielten in 5 ml Hyaluronsäure (0,6 mg/ml).Transferrin wurde in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben. Die Bestrahlung erfolgte in einer Siemens Dermopan-Röntgenradiolyse-Einheit unter Begasung mit N_2 bzw. O_2 bei einer Betriebsspannung von 50 kV.

Es wurde daher eine Strategie verfolgt, um die zweite Reaktion zu bevorzugen. H_2O_2 wurde von Anfang an in einer Endkonzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Die stationäre Konzentration der Radikale wurde möglichst niedrig gehalten ($3{,}5 \cdot 10^{-8}$ - $2{,}44 \cdot 10^{-7}$ M), damit ihre Reaktion miteinander gegenüber einer Reaktion mit H_2O_2 benachteiligt wird. Jedoch war unter diesen Reaktionsbedingungen kein deutlicher Abbau der Hyaluronsäure zu beobachten.

Bei einer höheren Konzentration der Sauerstoffradikale

System	Erzeugte Radikale	$\Delta\eta_{rel}$(cSt.) bei einer Radikalkonzentration von 2,90 µM	% $(\Delta\eta_{rel})_o$	$\Delta\eta_{rel}$(cSt.) bei 1,74 µM-Radikalkonzentration	% $(\Delta\eta_{rel})_o$
Hyaluronsäure	-	0,7646	100,00	0,7646	100,00
Hyaluronsäure	$\cdot OH$, e^-_{aq}	0,2070	27,07	0,2894	37,85
Hyaluronsäure	$\cdot OH$, $\cdot O_2^-$	0,3865	50,65	0,4541	59,39
Hyaluronsäure + Transferin + H_2O_2	-	0,7857	100,00	0,7857	100,00
Hyaluronsäure + Transferrin + H_2O_2	$\cdot OH$, e^-_{aq}	0,2577	32,80	0,3717	47,31
Hyaluronsäure + Transferrin + H_2O_2	$\cdot OH$, $\cdot O_2^-$	0,4393	55,91	0,5111	65,05

Tab. 22: Einfluß verschiedener Konzentrationen von $\cdot OH$ und $\cdot O_2^-$ auf die Viskosität der Hyaluronsäure. H_2O_2 war in einer Endkonzentration von 10 µM vorhanden. Die Bestrahlungszeit betrug 2 Minuten. Experimentelle Einzelheiten sind wie für Tabelle 21.

(1,74 bis 2,90 µM) konnte erneut beobachtet werden, daß trotz der Gegenwart eines Überschusses an H_2O_2 die Reaktion von Superoxid mit OH dominiert (Tabelle 22).

Es ist auf jeden Fall ersichtlich, daß die Viskosität bei höherer Radikalkonzentration schneller abnimmt. Transferrin übt eher einen Schutzeffekt aus, d.h. daß $^{\cdot}OH$-Radikale auch mit dem Protein reagieren.

Hydroxylradikale sind also in der Lage, Hyaluronsäure abzubauen und spielen möglicherweise auf diese Weise eine Rolle bei inflammatorischen Reaktionen. Es war aber erneut nicht nachweisbar, ob diese Radikale sekundär aus $^{\cdot}O_2^-$ in einer effektiven Konzentration entstehen.

3.4.6.3. Weitere Versuche zum Nachweis der Entstehung von $^{\cdot}OH$-Radikalen aus $^{\cdot}O_2^-$

Obwohl mehrere Autoren nicht in der Lage waren, die sekundäre Produktion von $^{\cdot}OH$ über Superoxid nachzuweisen, wird eine solche Reaktion für viele Effekte in der Biochemie angeregter Sauerstoffspezies verantwortlich gemacht. Kellogg und Fridovich gingen sogar so weit zu postulieren, daß auch $^1\Delta_gO_2$ bei der Umsetzung

$$^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + {}^1\Delta_gO_2$$

entsteht und daß sowohl OH als auch Singulett-Sauerstoff für die Lipidperoxidation verantwortlich sind (76). Die von diesen Autoren beschriebenen Reaktionen sollten überprüft werden.

Die postulierte Kooxidation von 2,5-Dimethylfuran, einem $^1O_2$-Abfangreagens, während der Umsetzung von Acetaldehyd mit Xanthinoxidase erwies sich als eine rein subjektive Interpretation. Die Produktanalyse erfolgte dünnschichtchro-

matographisch nach Extraktion der angesäuerten Reaktionsansätze mit $CHCl_3$. Das Laufmittel war Aceton/Benzol (1:10). Die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe einer H_2SO_4/Äthanol-Mischung (1:1) sichtbar gemacht. Ein Unterschied der gebildeten Produktmengen in Abwesenheit und in Gegenwart von Katalase, Cuprein, Mannit, $Cu(Tyr)_2$ oder $Cu(Lys)_2$ war nicht zu sehen.

Kein Unterschied war bei der Peroxidation von Linolensäure in dem gleichen System in Abwesenheit und in Gegenwart von 3,2 µM Superoxiddismutase zu vermerken. Die Peroxidation selber verlief äußerst langsam. Die Reaktion zwischen $^{\cdot}O_2^-$ und H_2O_2, die $^{\cdot}OH$ und $^1\Delta_gO_2$ ergeben soll, konnte also erneut nicht bewiesen werden. Bis man eine direkte Nachweismethode für diese angeregten Sauerstoffspezies gefunden hat, wird dieses Gebiet ein Feld der Spekulationen bleiben.

3.5. Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an weiteren enzymatischen Reaktionen

Die niedermolekularen Cu-Chelate, die eine superoxiddismutative Wirkung aufweisen, konnten im zellulären Geschehen als Indikatoren für die Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an mikrosomalen Hydroxylierungs- und Dealkylierungsreaktionen erfolgreich eingesetzt werden (147-150,258). Diese Anwendungsmöglichkeit sollte auf reine Enzymsysteme ebenfalls zum Nachweis der Beteiligung von Superoxid an der katalytischen Reaktion ausgedehnt werden. In diesem Zusammenhang sind die Oxidasen und die Oxygenasen von besonderer Bedeutung, da bei diesen Umsetzungen der Sauerstoff aktiviert werden muß. Hier wurden die Reaktionen der kupferhaltigen Aminoxidasen untersucht.

3.5.1. Die Diaminoxidase-Reaktion

Im Laufe der Oxidation von 1,4-Diaminobutan durch Diaminoxidase konnten Rotilio et al. bei pH 10 beobachten, daß eine Koreduktion von Cytochrom c stattfand und die Autoxidation von Sulfit iniziiert wurde. Bei niedrigem pH verhinderte das bei der Diaminoxidase-Reaktion freiwerdende Peroxid diese Reaktionen (273). Daraus folgerten die Autoren, daß im Verlauf des katalytischen Zyklus $^{\cdot}O_2^-$ entsteht. Sie konnten aber nicht zeigen, ob dieses Sauerstoffradikal an der Reaktion beteiligt ist oder nicht.

Der Einfluß der Superoxiddismutase-aktiven $Cu(Tyr)_2$, $Cu(Lys)_2$ und $CuSO_4$ auf die Oxidation von 1,4-Diaminobutan durch Diaminoxidase aus Schweinenieren wurde gemessen (274). Die Diaminoxidase-Aktivität wurde spektralphotometrisch bestimmt (250). Dabei wurde das gebildete γ-Aminobutylaldehyd von o-Aminobenzaldehyd abgefangen, wobei sich ein Farbstoff bildete, der bei 430 nm eine charakteristische Absorption besaß. $Cu(Tyr)_2$ inhibierte die Produktbildung in einer effektiven und signifikanten Weise (Abb. 10).

Während native 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase keinen Hemmeffekt aufwies, konnten auch $Cu(Lys)_2$ und $CuSO_4$ die Diaminoxidase-Reaktion inhibieren (Tabelle 23). Das zeigt, daß die Superoxidradikale an einer Stelle des Enzyms produziert werden, die für das große Cuprein-Molekül nicht zugänglich ist.

Die Liganden alleine beeinflußten die Reaktion nicht. Um ausschließen zu können, daß die Hemmung durch Cu^{2+} eventuell auf eine Schwermetallvergiftung zurückzuführen sei, wurde der Einfluß von Cd^{2+}, einem Schwermetallion von vergleichbarer Toxizität, getestet. Bis zu einer Endkonzentration von 100 µM blieb $CdCl_2$ ohne Wirkung.

Diese Ergebnisse weisen stark auf die Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ am katalytischen Zyklus der Diaminoxidase-Reaktion hin. Es

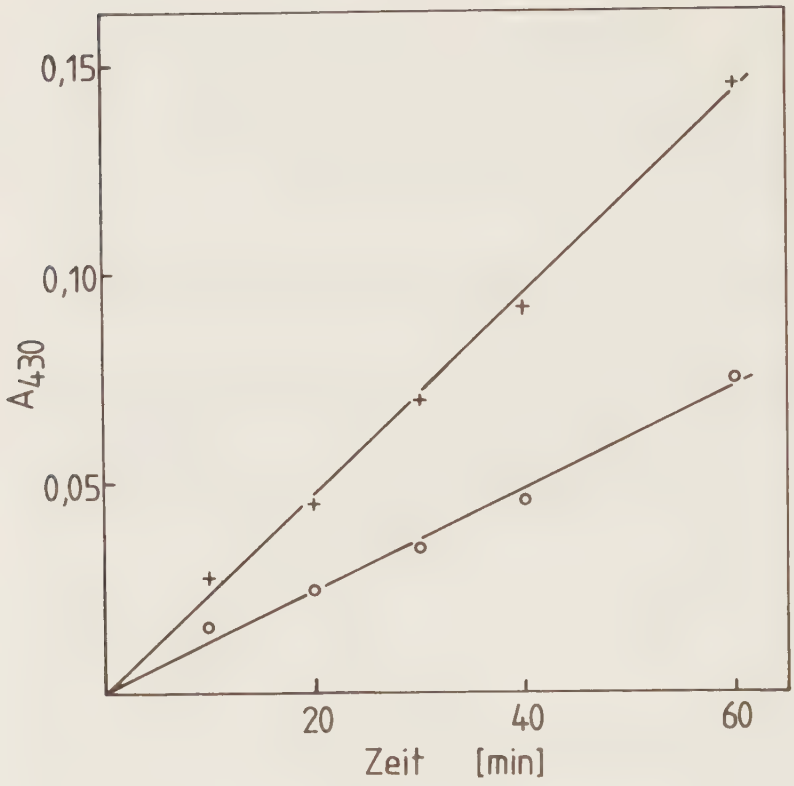


Abb. 10: Hemmeffekt von $Cu(Tyr)_2$ auf die Reaktion der Diaminoxidase. In einem Gesamtvolumen von 5 ml enthielt der Inkubationsansatz: 67 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, 2,5 mM o-Aminobenzaldehyd, 10 mM 1,4-Diaminobutanhydrochlorid und 180 mU Diaminoxidase. Nach Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 10 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Nach Zentrifugation wurde das Produkt der Reaktion des gebildeten Aldehyds mit o-Aminobenzaldehyd bei 430 nm spektrometrisch gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. -x-x-x-: Kontrolle; -o-o-o-: + 60 µM $Cu(Tyr)_2$.

handelt sich hierbei um einen Ping-Pong-Mechanismus. Im ersten, anaeroben Schritt wandelt das enzymgebundene Pyridoxalphosphat das Amin in die Aldehydform um und wird selbst in die Pyridoxaminform gebracht. Der zweite, aerobe Schritt wird gestartet durch die Bildung eines binären Komplexes mit O_2. Nach Freisetzung von H_2O_2 wird die native Enzymform regeneriert (275). Die Aktivierung des Sauerstoffs zu Superoxid kann also erst im zweiten Schritt der Reaktionsfolge stattfinden.

Zusatz	Konzentration (µM)	% Hemmung
keiner	-	0,0
Cuprein	0,1	0,0
Cuprein	1,0	0,0
$Cu(Tyr)_2$	6,0	11,1
$Cu(Tyr)_2$	60,0	48,9
$Cu(Lys)_2$	9,3	6,7
$Cu(Lys)_2$	93,0	34,4
$CuSO_4$	10,0	14,4
$CuSO_4$	100,0	48,9
Tyrosin	100,0	0,0
Lysin	105,0	0,0
$CdCl_2$	100,0	0,0

Tab. 23: Hemmung der Diaminoxidase durch SOD-aktive Cu(II)-Chelate. Die Reaktion wurde nach 40 Minuten gestoppt. Experimentelle Einzelheiten sind in der Legende zu Abb. 10 angegeben.

3.5.2. Die Monoaminoxidase-Reaktion

Zum Vergleich wurde die Oxidation von Benzylamin durch Monoaminoxidase aus Rinderplasma untersucht. In einem analogen Versuch zu dem in (273) beschriebenen wurde beobachtet, daß bei pH 7,0 keine Koreduktion von Cytochrom c stattfand, obwohl die Benzylaminoxidation unbehindert verlief. Bei pH 10,0 hingegen, bei dem die Denaturierung von Cytochrom c durch das produzierte H_2O_2 zurückgedrängt wurde, konnte parallel zur Oxidation von Benzylamin eine signifikante Reduktion von Cytochrom c beobachtet werden. Das war ein Hinweis auf eine mögliche Erzeugung von $^{\cdot}O_2^-$ während der Monoaminoxidase-Reaktion.

Die Diaminoxidase-Aktivität wurde bestimmt, indem die Oxidation von Benzylamin zu Benzaldehyd verfolgt wurde (248). Die oxidierte Substratmenge wurde spektralphotometrisch bestimmt (249). Jedoch waren weder native 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase (bis zu einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ M) noch die SOD-aktiven $Cu(Tyr)_2$, $Cu(Lys)_2$, die Cu(II)-Salicylate und $CuSO_4$ (jeweils bis zu $9 \cdot 10^{-5}$ M) in der Lage, die Reaktion zu hemmen, auch nicht bei pH 10. DABCO und t-Butanol vermochten auch keine Inhibition zu bewirken, was eine Beteiligung von $^1\Delta_g O_2$ bzw. $^{\cdot}OH$ an der Katalyse ziemlich unwahrscheinlich erscheinen läßt. Die Monoaminoxidase-Reaktion verläuft demnach höchstwahrscheinlich nach einem anderen Mechanismus als die Diaminoxidase-Reaktion.

3.6. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von Modellkomplexen der blauen Kupferproteine

Aufgrund der Tatsache, daß einige der blauen Kupferproteine mögliche Reaktionspartner für Superoxid im zellulären Geschehen sind (193-196), und da die allgemeine Funktion proteingebundenen Kupfers letzten Endes ein Elektronentransfer

auf Sauerstoff darstellt (88), war es von besonderem Interesse, die Reaktion des blauen Cu-Proteins Plastocyanin, dem eine direkte Reaktion mit $\cdot O_2^-$ im Verlauf der Photosynthese zugeschrieben wird (193), mit Superoxid zu untersuchen. Um die Reaktivität jedoch besser verstehen zu können, war eine vorhergehende strukturelle Untersuchung unerläßlich, vor allem um die Struktur des aktiven Zentrums und dessen Zugänglichkeit zu erfassen. Zum Vergleich wurden die Struktur und die Reaktivität einiger der vorgeschlagenen Modelle der blauen Kupferzentren untersucht (276). Hierbei handelte es sich um Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$, Cu_7(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_7(ClO_4)_2$ (214,215), $[Cu_{14}$(D-Penicillamin)$_{12}Cl]^{-5}$ (211), Cu-α-Mercaptopropionylglycin (208) und Cu-N-Mercaptoacetylglycyl-L-histidin. Alle diese Komplexe wurden auf ihre Reinheit überprüft und zeigten die gleichen Absorptionseigenschaften wie in der Literatur beschrieben. Da bei all diesen Chelaten eine Cu-S-Koordination vorliegt, wurden zum Vergleich der Struktur andere Kupferkomplexe synthetisiert, bei denen ebenfalls eine Bindung des Kupfers an den Schwefel vorliegt, und zwar Cu(2-Mercaptobenzothiazol)$_2$, Cu-Diäthyldithiocarbamat und Cu(Äthylendiamin)$_2(SCN)_2$ (236).

3.6.1. Strukturelle Untersuchungen von Plastocyanin und Cu-Modellchelaten

Da insbesondere das aktive Zentrum, vor allem aber die Oxidationsstufe des Kupfers und dessen Schwefelliganden von Interesse waren, boten sich vor allem die Röntgenphotoelektronenspektrometrie und die chiroptischen Meßmethoden an.

3.6.1.1. Röntgenphotoelektronenspektrometrie

Die Tatsache, daß bei den blauen Kupferproteinen und bei den erwähnten Modellchelaten dieser Chromophore ein S(π)→ Cu-"Charge-Transfer" auftritt, läßt vermuten, daß die Oxidationsstufe des Kupfers verändert sein könnte. Röntgenphotoelektronenspektrometrie ist die Methode der Wahl, um Informationen über den Oxidationszustand des Kupfers in diesen Cu-S-Chromophoren zu vermitteln. Das Vorliegen von 3 d^{10} Cu (Cu(I)) in verschiedenen Cu-Proteinen (225,226) und in niedermolekularen Kupferkomplexen, die anorganischen Schwefel, RS^- und RSSR enthielten (220-224), konnte mit Hilfe dieser Methode gezeigt werden. Aufgrund von apparativen Beschränkungen jedoch, erlaubt das Signal-Rausch-Verhältnis im Moment keine eindeutige Zuordnung der Oxidationsstufe bei kleinem Konzentrationsverhältnis von Cu:Protein, wie es bei den blauen Proteinen der Fall ist.

Obwohl eine solche eindeutige Zuordnung nicht möglich war, vor allem da die Auflösung das Erkennen von möglichen Satelliten (die für Cu(II) charakteristisch wären) nicht erlaubte, lag die Bindungsenergie des Kupfers sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Plastocyanin aus Petersilie bei 931,9 eV (Abb. 11). Die Aussagekraft dieser Feststellung sollte nicht überbewertet werden; sie ist aber ein Hinweis darauf, daß sich der Oxidationszustand des Kupfers bei der Reduktion wahrscheinlich nicht ändert.

Die XPS-Spektren des Schwefels zeigten ein Hauptsignal bei 163,1 eV für das reduzierte und 162,3 eV für das oxidierte Plastocyanin. Nebensignale geringerer Intensität bei höherer Bindungsenergie (165-166 eV) wurden ebenfalls gemessen (Abb. 12). Solche "Satelliten" wurden von Solomon et al. auf eine S^+-Koordination von Cu(II) in blauen Proteinen zurückgeführt (228,229), während Peeling et al. die entsprechenden Nebensignale auf die Verunreinigung der Proben mit anorganischem Schwefel zurückführten (230).

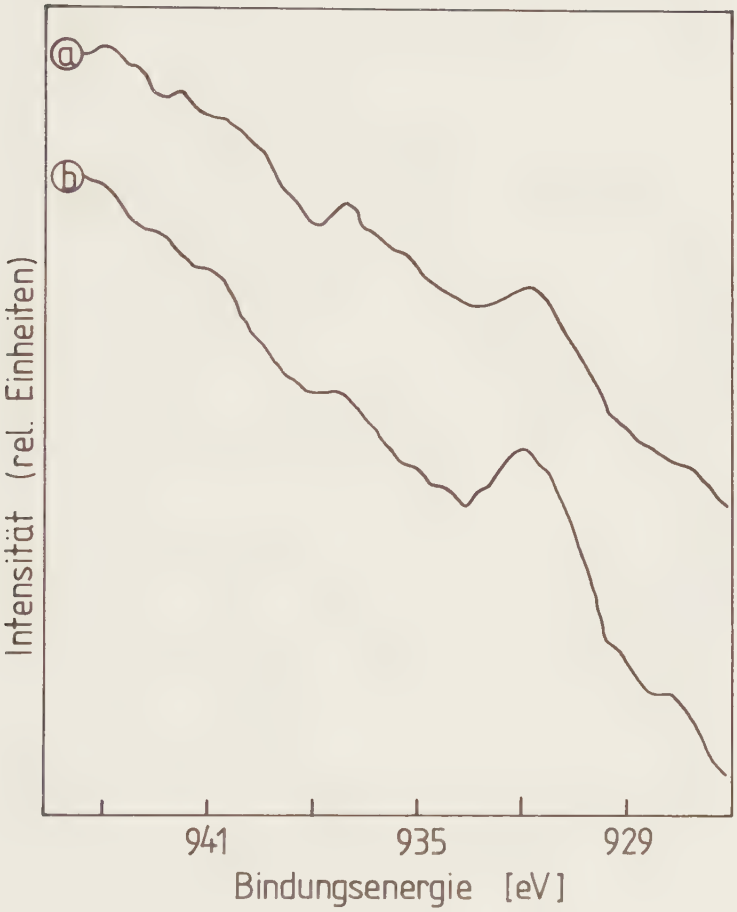


Abb. 11: XPS-Spektren von ⓐ oxidiertem und ⓑ reduziertem Plastocyanin aus Petersilie. Die Spektren wurden von entsalzten und lyophilisierten Proben aufgenommen. Die experimentellen Bedingungen waren dieselben wie für Abb. 3, mit Ausnahme der Tatsache, daß die Zahl der Scans 100 betrug.

Abb. 12: Röntgenphotoelektronenspektren des Schwefels von ⓐ oxidiertem und ⓑ reduziertem Petersilien-Plastocyanin. Für Einzelheiten siehe Legende zu Tabelle 11.

Neuere Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe ergaben, daß das Plastocyanin während der Messung durch die Röntgenstrahlen beschädigt wird. Es entstehen Spaltprodukte. Der Grad der Zerstörung nimmt mit der Bestrahlungszeit zu (Stephan Zienau, geplante Diplomarbeit).

Da eine eindeutige Zuordnung der Oxidationszahl von Plastocyanin-Cu nicht möglich war, wurde die Bindungsenergie des Kupfers in Modellkomplexen blauer Cu-Proteine bestimmt. Die Bindungsenergie des Cu $2p_{3/2}$-Niveaus lag für Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$ bei 932,1 eV und für Cu_7(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_7(ClO_4)_2$ bei 933,0 eV. In beiden Fällen wurden keine der für Cu(II)-Verbindungen charakteristischen Satelliten beobachtet. Das zeigt, daß das Kupfer in beiden Chelaten in einer 3 d^{10}-Konfiguration vorlag. Die Bindungsenergie der S 2p-Elektronen lag bei 162,4 eV im ersten und bei 163,0 eV im zweiten Fall (Abb. 13).

Die Werte für die Cu $2p_{3/2}$-,Cu $2p_{1/2}$- und S 2p-Bindungsenergien dieser beiden Komplexe und weiterer vorgeschlagener Modellchelate des Schwefel-koordinierten Kupfers in Typ 1 Cu-Proteinen sind in Tabelle 24 zusammengefaßt. Weitere Chelate, bei denen ebenfalls eine Cu-S-Koordination vorliegt, z.B. Cu-Diäthyldithiocarbamat und Cu-Mercaptobenzothiazol, wurden auch untersucht. Unabhängig von der geometrischen Struktur, d.h. quadratisch-planar oder verzerrt-tetraedrisch, lag das Kupfer ausschließlich in einer 3 d^{10}-Elektronenkonfiguration, die eine Oxidationsstufe von +1 nach der Definition von Jørgensen (277) entspricht. Zur Kontrolle, daß keine Photoreduktion ursprünglicher 3 d^9-Spezies stattgefunden hat, wurde Cu(Äthylendiamin)$_2$(SCN)$_2$, bei dem aus Röntgenstrukturdaten eine S-Cu-Koordination nachgewiesen wurde (236), untersucht. Hier behielt das Kupfer seine 3 d^9-Konfiguration bei, sein Spektrum zeigte die für Cu(II)-Spezies charakteristischen Satelliten (Tabelle 24). Eine Photoreduktion sowie ein mögliches Fehlen der "shake-up"-Prozesse, die zu der Bildung der Satelliten bei Cu(II)-Verbindungen führen, bei Schwefelkoordination können

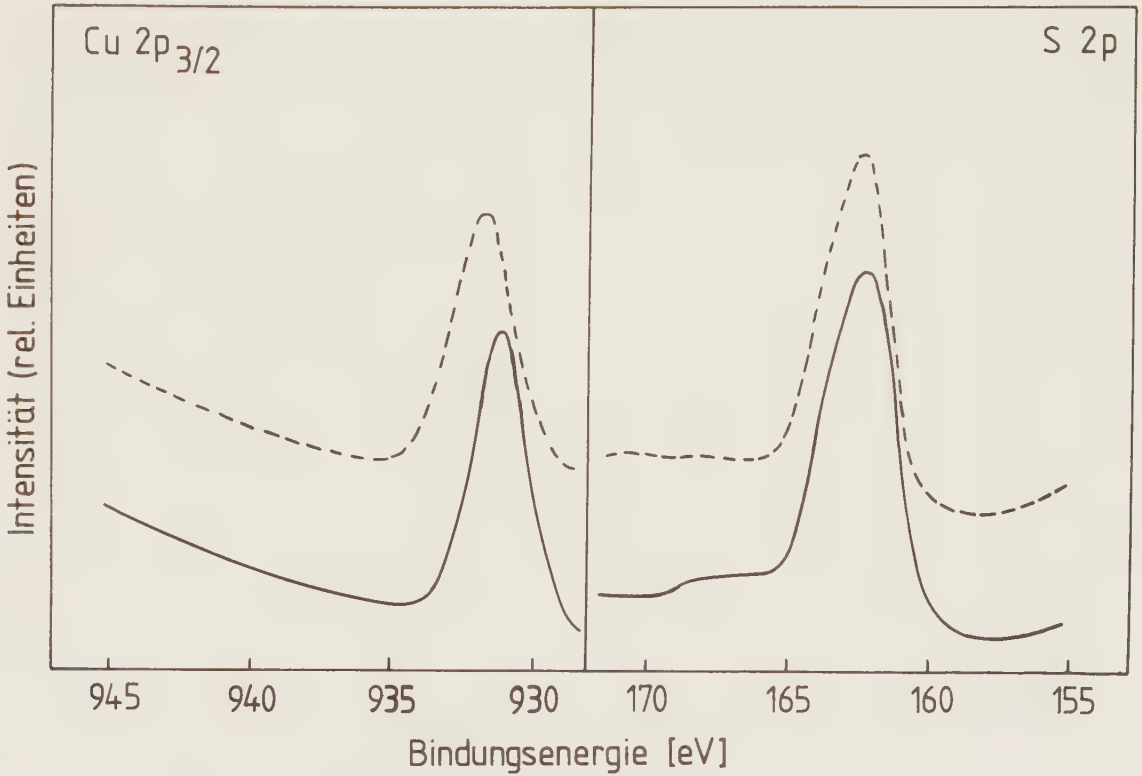


Abb. 13: XPS-Spektren der Cu $2p_{3/2}$- und der S 2p-Niveaus der Cu-Komplexe von 1-Methyl-2-mercaptoimidazol. Die Meßbedingungen sind in der Legende zu Abb. 3 angegeben.
——: Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$; ---: Cu_7(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_7$(ClO_4)$_2$.

Complex	Cu $2p_{3/2}$		Cu $2p_{1/2}$		S 2p (eV)
	satellite	main peak (eV)	satellite	main peak (eV)	
Cu-α-mercaptopropinylglycine	-	933,0	-	953,2	163,9
Cu-N-mercaptoacetyl-glycyl-L-histidine	-	932,1	-	952,1	163,0
Cu(1-methyl-2-mercaptoimidazole)$_2$	-	932,1	-	952,3	162,4
[Cu_7(1-methyl-2-mercaptoimidazole)$_7$ (ClO_4)$_2$]	-	933,0	-	953,1	163,0
[Cu_{14}(D-penicillamine)$_{12}Cl$]$^{5-}$	-	933,4	-	953,2	163,2
Cu(2-mercaptobenzothiazol)$_2$	-	931,9	-	951,7	162,4
Cu-diethyldithiocarbamate	-	931,8	-	951,6	161,5
Cu(ethylendiamine)$_2$ (SCN)$_2$	944,0	932,0	963,0	952,0	161,7

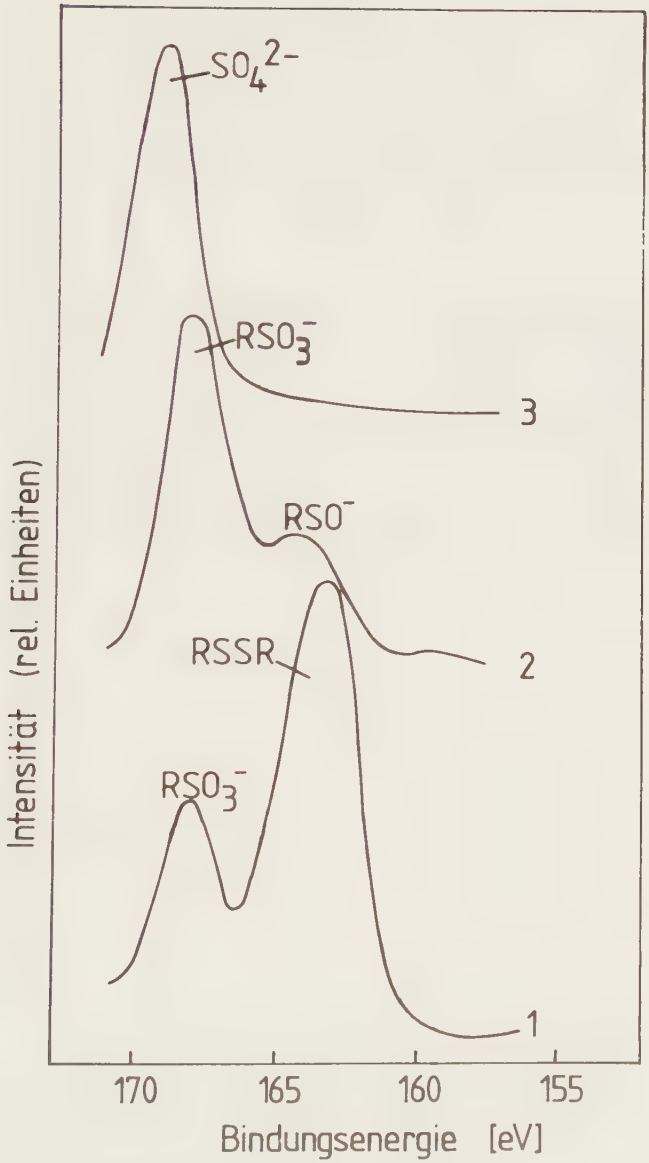
Tab. 24: Elektronenbindungsenergien und Satellitaufspaltung verschiedener Cu-S-Chelate. Experimentelles: siehe Abb. 3.

also für die restlichen Cu-S-Komplexe ausgeschlossen werden.

Es waren in der Hauptsache die Chelate, die eine starke, auf ein S(π)→Cu-"Charge-Transfer" zurückzuführende Absorptionsbande im Blauen zeigen, die eine Delokalisation der Elektronen aufwiesen, wobei diese eine höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Nähe des Kupfers besaßen und daher die 3 d^{10}-Spezies erscheinen ließen. Cu(Äthylendiamin)$_2$ $(SCN)_2$ erwies sich als eine Cu(II)-Verbindung. Hier ist die Polarisierung des Schwefels durch das gebundene Kupfer abgeschwächt: einerseits ist infolge der Jahn-Teller-Verzerrung der Cu-S-Abstand 3,27 Å, daraus folgt eine schwächere Kupfer-Schwefel-Wechselwirkung. Andererseits induziert die am Schwefel gebundene elektrophile CN^--Gruppe eine Polarisation der Schwefelelektronen in der entgegengesetzten Richtung. Dies zeigt sich in der niedrigen Bindungsenergie der N 1s-Elektronen von 398 ± 1 eV bei vielen SCN^--Salzen (221) im Gegensatz zu den um 400 eV liegenden "normalen" Werten (221-224).

Da Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$ viele der charakteristischen Eigenschaften blauer Kupferzentren zeigt und verhältnismäßig gut wasserlöslich ist, wurde dieser Komplex für Redox-Titrationsuntersuchungen verwendet. In Gegenwart von H_2O_2 im molaren Verhältnis 1:1, 1:10 und 1:100 war eine zunehmende Oxidation des Thiolatschwefels zu beobachten (Abb. 14).

Abb. 14: XPS-Spektren der S 2p-Elektronen von Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$ in Gegenwart steigender Mengen von H_2O_2. Die Meßbedingungen sind wie für Abb. 3. Molares Verhältnis Cu:H_2O_2 ① = 1:1 , ② = 1:10, ③ = 1:100.


SO_4^{2-}
RSO_3^-
3
RSO^-
RSSR
2
RSO_3^-
1
Intensität (rel. Einheiten)
170
165
160
155
Bindungsenergie [eV]

Bei dem gleichen Titrationsexperiment verschob sich die Bindungsenergie des Kupfers bei einem molaren Verhältnis von 1:10 zu 934,9 eV hin und ein Satellit erschien bei 944,0 eV, der auf das Vorhandensein von Cu(II) hinwies. Bei einem hundertfachen Überschuß an Peroxid war nur noch Cu(II) zu finden (Hauptsignal: 935,5 eV, Satellit 944,0 eV) (Abb. 15).

Die Oxidierbarkeit des Kupfers durch einen zehnfachen Überschuß an Wasserstoffperoxid, wobei 3 d^9-Cu gebildet wird, hat ihr Gegengewicht in der Tatsache, daß ein zehnfacher Überschuß in Ascorbat gar keinen Einfluß auf die Bindungsenergien sowohl von Schwefel als auch von Kupfer hat (Tabelle 25). Diese Beobachtung zeigt, daß das im Komplex vorliegende Cu nicht weiter reduziert werden kann und beweist, daß das Kupfer tatsächlich in einer 3 d^{10}-Elektronenkonfiguration vorlag.

Abb. 15: Bindungsenergie der Cu $2p_{3/2}$-Elektronen von Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$ in Gegenwart steigender Mengen H_2O_2. Zugegebene H_2O_2-Menge in Mol pro g-Atom Cu: ① 1; ② 10; ③ 100.

Cu 2p3/2
③
②
①
INTENSITÄT (rel. Einheiten)
945
940
935
930
BINDUNGSENERGIE [eV]

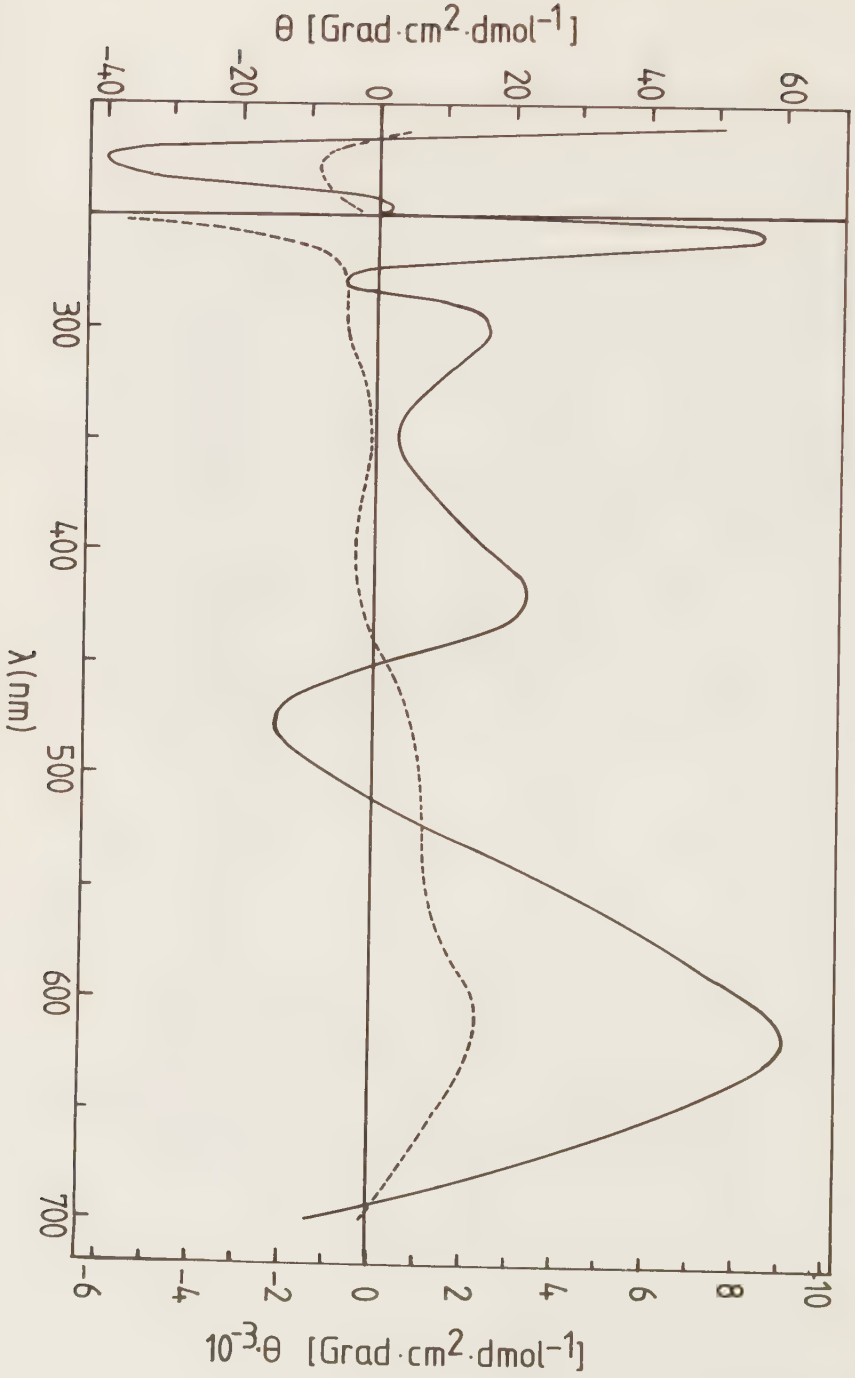
Zusatz	Cu $2p_{3/2}$		Cu $2p_{1/2}$		S 2p (eV)
	Satellit	Hauptsignal (eV)	Satellit	Hauptsignal (eV)	
keiner	-	932,1	-	952,3	162,4
Ascorbat (10:1)	-	932,7	-	952,2	162,3
H_2O_2 (10:1)	944,0	934,9; 932,8	961,5	954,4; 952,8	168; 164,3

Tab. 25: Einfluß eines zehnfachen Überschussen von Ascorbat bzw. H_2O_2 auf die Cu $2p_{3/2}$-, Cu $2p_{1/2}$- und S 2p-Bindungsenergien von Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$. Die Meßbedingungen waren die gleichen wie für Abb. 3.

3.6.1.2. Circulardichroismus

Um die Geometrie der Chromophore von Modellchelaten blauer Cu-Proteine mit der Struktur des blauen Kupferzentrums von Plastocyanin zu vergleichen, boten sich die chiroptischen Methoden an. Die wasserlöslichen Modellkomplexe Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$, Cu-α-Mercaptopropionylglycin und Cu-N-Acetylglycyl-L-histidin waren chiroptisch inaktiv, im Gegensatz zu nativem Plastocyanin aus Petersilie und Cu-D-Penicillamin. Das bedeutet, daß zwar die Cu-S-Koordination für die ungewöhnlichen spektralen Parameter blauer Kupferchromophore verantwortlich sind, daß aber eine verzerrte Geometrie des aktiven Zentrums im nativen Protein durch das Makromolekül induziert wird. Nur bei einer Verbindung wie $[Cu_{14}(\text{D-Penicillamin})_{12}Cl]^{5-}$, einer Spezies mit relativ hohem Molekulargewicht (2200 Daltons), kann eine solche Verzerrung erwartet werden. Von Interesse ist, daß sowohl das Plastocyanin als auch Cu-D-Penicillamin eine positive Cotton-Bande um 600 nm aufwiesen. Dem negativen Cotton-Effekt um 400 nm beim Modellchelat entsprach ein positiver beim nativen Protein (Abb. 16).

Abb. 16: Circulardichroismus-Spektren von Plastocyanin aus Petersilie (———) und Cu-D-Penicillamin (-----). Küvetten von 0,1, 1 und 10 mm Lichtweg wurden verwendet. Die Temperatur lag bei 25°C. Die Konzentrationen betrugen für das Plastocyanin $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ M, für Cu-Penicillamin $5{,}67 \cdot 10^{-4}$ M.


θ [Grad·cm²·dmol⁻¹]
-40
-20
0
20
40
60
λ(nm)
300
400
500
600
700
10⁻³·θ [Grad·cm²·dmol⁻¹]
-6
-4
-2
0
2
4
6
8
10

3.6.2. Zur Reaktion des Plastocyanins mit Superoxid

Plastocyanin aus Petersilie ließ sich durch Einwirken des Xanthin-Xanthinoxidase-Systems reduzieren. Im Testansatz betrug die Konzentration des Plastocyanin-Kupfers 20 µM. Die Reduktion des Proteins wurde durch Verfolgen der für oxidiertes Plastocyanin charakteristischen Absorptionsbande bei 597 nm bestimmt. Sowohl natives Cuprein als auch $Cu(Lys)_2$ konnten diese Reduktion hemmen (Abb. 17).

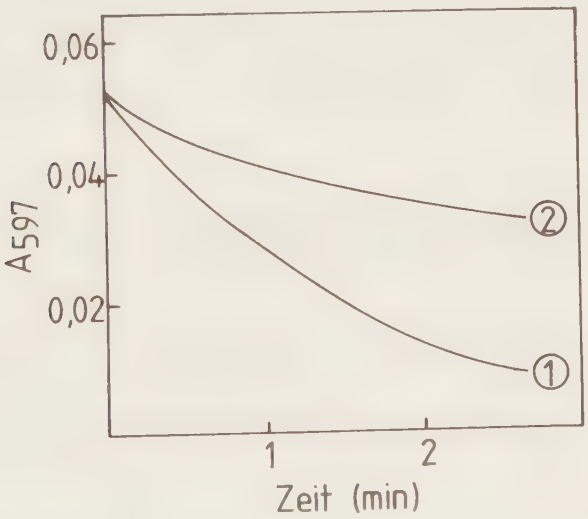


Abb. 17: Reduktion des Plastocyanins durch Xanthin und Xanthinoxidase. Der Testansatz enthielt: 20 µM Plastocyanin, 100 µM Xanthin, 0,02 U/ml Xanthinoxidase und 0,03 U/ml Katalase. Verfolgt wurde die Absorption bei 597 nm. ① ohne Zusatz; ② in Gegenwart von $3,1 \cdot 10^{-8}$ M Cuprein-Cu bzw. $9,1 \cdot 10^{-4}$ M $Cu(Lys)_2$.

Wurden Xanthin und Xanthinoxidase durch eine gesättigte KO_2-Lösung in DMSO ersetzt, so war ebenfalls eine Reduktion des Plastocyanins zu beobachten, die in Gegenwart von 2,9 µM Cuprein-Cu sowie bei Zugabe von $Cu(Lys)_2$ in einer Endkonzentration von 50 µM zu 50 % gehemmt wurde.

Bei gleichzeitigem Vorliegen von Plastocyanin und Cytochrom c trat in Gegenwart sowohl von Xanthin und Xanthinoxidase als auch von KO_2 eine Konkurrenz um die Reduktionsäquivalente auf. Hierbei war Plastocyanin in der Lage, die Reduktion des Cytochrom c zu unterbinden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Plastocyanin (und wahrscheinlich auch andere blaue Kupferproteine) mit $^{\bullet}O_2^-$ reagieren können und daher potentielle Reaktionspartner von angeregten Sauerstoffspezies im zellulären Geschehen sind.

3.6.3. Reaktion des Superoxidradikals mit den Modellverbindungen

Mit Hilfe von indirekten Bestimmungsmethoden der Superoxiddismutase-Aktivität wurde die Fähigkeit der Modellverbindungen blauer Kupferproteine, mit Superoxidradikalen zu reagieren, getestet. Da - wie bereits öfters ausgeführt - diese Reaktionen nicht spezifisch für $^{\bullet}O_2^-$ sind, sind die so gewonnenen Ergebnisse nur qualitativer Natur.

Wie bereits beschrieben, ist Cu-D-Penicillamin Superoxiddismutase-aktiv, wobei das durch Cu(I) stabilisierte Schwefelradikal höchstwahrscheinlich die reaktive Spezies darstellt. Die wasserlöslichen Modellkomplexe hemmten die Reduktion von Cytochrom c durch Xanthin und Xanthinoxidase mit unterschiedlicher Effektivität (Tabelle 26). Cu-N-Mercaptoacetylglycyl-L-histidin war in der Lage, Cytochrom c in Abwesenheit von Xanthin und Xanthinoxidase zu reduzie-

ren. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen von Cu(I), wobei ein direkter Elektronentransfer von der Hämgruppe von Cytochrom c auf das Kupfer stattgefunden haben müßte.

Cu-Chelat	Konzentration, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt (µM Cu)
2Cu,2Zn-Superoxid-dismutase	0,02
Cu-α-Mercaptopropionylglycin	2,52
Cu(1-Methyl-2-mercaptoimidazol)$_2$	18,30
[Cu$_{14}$(D-Penicillamin)$_{12}$Cl]$^{5-}$	150,00

Tab. 26: Hemmeffekt von Modellkomplexen blauer Kupferproteine im Cytochrom c-Reduktase-Test. Experimentelles: siehe Tabelle 9.

Auch die Reduktion des Nitrotetrazoliumblaus durch das Xanthin-Xanthinoxidase- (Tabelle 27) bzw. das KO_2-System (Tabelle 28) konnten durch die untersuchten Cu-Modellkomplexe gehemmt werden.

Die Liganden alleine blieben in allen Testsystemen inaktiv. Die Cu-Chelate beeinflußten die Xanthinoxidase-Reaktion selber nicht.

Diese Ergebnisse stellen grobe Beweise für die Reaktivität der Modellkomplexe von blauen Kupferproteinen mit $\cdot O_2^-$ dar. Aufgrund der Tatsache, daß auch natives Plastocyanin mit Superoxid reagiert, ergibt sich somit ein weiterer Hinweis auf die Brauchbarkeit dieser Chelate als Modelle für Typ 1 Kupfer.

Cu-Chelat	Konzentration, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt (µM Cu)	Verhältnis Cu (Cuprein): Cu (Chelat)
2Cu,2Zn-Superoxiddismutase	0,04	-
Cu-α-Mercaptopropionylglycin	2,50	1 : 63
Cu-N-Mercaptoacetyl-L-histidin	3,30	1 : 83
$Cu(1\text{-Methyl-2-mercaptoimidazol})_2$	4,20	1 : 105
$[Cu_{14}(\text{D-Penicillamin})_{12}Cl]^{5-}$	4,30	1 : 108

Tab. 27: Hemmung der durch Xanthin und Xanthinoxidase vermittelten Formazanbildung durch Cu-Modellchelate. Experimentelle Bedingungen: vergleiche Tab. 10.

Cu-Chelat	Konzentration, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt (µM Cu)	Verhältnis Cu (Cuprein): Cu (Chelat)
2Cu,2Zn-Superoxiddismutase	0,06	-
Cu-α-Mercaptopropionylglycin	3,30	1 : 55
Cu-D-Penicillamin	10,00	1 : 167
$Cu(1\text{-Methyl-2-mercaptoimidazol})_2$	12,00	1 : 200
Cu-N-Mercaptoacteylglycyl-L-histidin	35,00	1 : 572

Tab. 28: Hemmung der durch KO_2 induzierten Reduktion von Nitrotetrazoliumblau durch die Modellchelate von Typ 1 Cu-Proteinen. Experimentelle Einzelheiten sind in der Legende zu Tabelle 11 angegeben.

4. DISKUSSION

4.1. Substratspezifität der Superoxiddismutase

Es besteht gar kein Zweifel, daß die Cupreine, sowie die analogen Mn- und Fe-haltigen Enzyme, in der Lage sind, die spontane Disproportionierung von Superoxidradikalen zu beschleunigen. Viele Tatsachen sprechen jedoch dagegen, daß diese Katalyse die eigentliche physiologische Funktion dieser Proteine ist.

Modellchelate, die eine enzymatische Katalyse nachahmen, sind für eine Reihe von Enzymen bekannt. Jedoch liegt die katalytische Aktivität solcher Komplexe in der Regel um Zehnerpotenzen unter der des nativen Enzyms (135-137). Im Fall der Superoxiddismutation jedoch zeigten niedermolekulare Cu-Chelate die gleiche enzymatische Aktivität wie natives Cuprein, auch in Gegenwart von Serumalbumin, einem biogenen Chelatbildner (131-133,260). $CuSO_4$ war sogar doppelt so aktiv wie das proteingebundene Cu der 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase. Aus den Produktanalysen ging hervor, daß es sich bei der Aktivität der Komplexe um eine echte Katalyse der spontanen Disproportionierung von Superoxid handelt. Es erhebt sich also die Frage: warum sollte die Natur solche komplizierten Moleküle wie die Superoxiddismutasen bauen, die obendrauf noch ubiquitären Vorkommens sind, wenn schon so einfache Komplexe, die auch in der Zelle zu finden sind, die Fähigkeit besitzen, die gleiche Funktion ebenso effektiv auszuüben? Die einzige Erklärung wäre darin zu finden, wenn diese Enzyme lokalisiert wären, und zwar so, daß sie in der Lage sind, $^{\cdot}O_2^-$-Radikale, die in einer hydrophoben Umgebung erzeugt werden, direkt abzufangen. In einer wässrigen Umgebung wäre die Lebensdauer des Radikals ohnehin gering.

Es ist nicht gesichtert, ob Superoxid toxisch ist. Möglich wäre, ja sogar wahrscheinlich, daß erst die Folgeprodukte

für die Zellschädigungen verantwortlich sind. Die Funktion der Cupreine könnte darin bestehen, die Bildung wesentlich reaktiverer Sauerstoffspezies, so das Hydroxylradikal und/oder Singulett-Sauerstoff, zu verhindern. Um diese Hypothese zu prüfen, müssen erst Methoden entwickelt werden, die es erlauben, diese reaktiven Sauerstoffspezies direkt zu messen.

Es ist das Dilemma der Biochemie aktivierter Sauerstoffspezies, daß man, mit Ausnahme der wenigen Fälle, in denen man Superoxid z.B. durch die charakteristischen Absorptions- und EPR-Parameter identifizieren konnte, auf indirekte Methoden angewiesen ist, wenn man die Entstehung von $^{\cdot}O_2^-$ und/oder anderer energiereicher Sauerstoffspezies nachweisen will. Die indirekten Nachweismethoden für Superoxid, die auch zur Bestimmung der SOD-Aktivität benützt werden, sind nicht besonders spezifisch für $^{\cdot}O_2^-$. Dies konnte hier am Beispiel der Nitrotetrazoliumblaureduktion sowie bei der Oxidation von Adrenalin und Hydroxylamin gezeigt werden. Bei der Nitrotetrazoliumblaureduktion ist es nicht verwunderlich, daß die Formazanbildung auch durch andere Reduktionsäquivalente außer $^{\cdot}O_2^-$, die bei der Xanthinoxidase-Reaktion entstehen können, induziert wird.

Die Adrenalinautoxidation verdient eine nähere Betrachtung. Die kontroverse Wirkungsweise SOD-aktiver Cu-Chelate einerseits und der nativen 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase andererseits zeigt, daß diese Reaktion nicht auf das Vorhandensein von $^{\cdot}O_2^-$ zurückzuführen ist. Die Beobachtungen von Schubotz und Weser (256), daß das Cu(II) des Cupreins während der Reaktion mit Adrenalin reduziert wird, daß sich ein ternärer Komplex zwischen dem Protein, dem Adrenalin und Sauerstoff bildet, und daß die Proteinkonformation sich während der Reaktion nicht verändert, deuten darauf hin, daß die Hemmung der Adrenalinautoxidation durch Cuprein nicht auf das Abfangen der für eine solche Reaktion angeblich benötigten Superoxidradikale beruhen kann. Dafür spricht auch

die Tatsache, daß es sich bei der Wirkung der Superoxiddismutase nicht um eine echte Hemmung der Autoxidationsreaktion handelt, sondern eher um eine Verlangsamung davon (257). Die Beobachtung, daß das Adrenalin-Semichinon bei $77^{o}K$ in Gegenwart von Cuprein gemessen werden konnte, während es sonst zu kurzlebig ist, um nachgewiesen zu werden (255), deutet darauf hin, daß das Cu-Protein in der Lage ist, diese Radikalspezies zu stabilisieren. Dies kann über eine direkte Bindung, wie sie in (256) vorgeschlagen wird, durchaus erfolgen. Im Gegensatz dazu scheinen die niedermolekularen Cu(II)-Komplexe direkt mit Adrenalin zu reagieren, indem sie ein Elektron entziehen. Das so entstandene Semichinon wird sofort oxidiert zum Adrenochrom (254).

Die mangelnde Spezifität der indirekten Nachweismethoden für Superoxid ist nicht auf die Adrenalinautoxidation oder die Formazanbildung beschränkt. Auch die Hemmung einer Reaktion durch die "Superoxiddismutasen" ist lange kein definitiver Beweis für die Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an dieser Reaktion. Die voreiligen Schlüsse vieler Autoren, Superoxidradikale seien an einer Reaktion beteiligt, wenn parallel zu dieser eine durch Cuprein hemmbare zweite Reaktion abläuft, z.B. eine Kooxidation von Adrenalin, sollten zumindest solange vermieden werden, bis die Substratspezifität der Cupreine und der analogen Eisen- und Manganenzyme ermittelt ist.

4.2. Die mögliche Rolle energiereicher Sauerstoffspezies bei inflammatorischen Reaktionen

Die Beteiligung verschiedener energiereicher Sauerstoffspezies an inflammatorischen Prozessen und an der Phagozytose wurde in letzter Zeit oft diskutiert. Bei der Phagozytose wird eine durch Superoxiddismutase hemmbare Chemi-

lumineszenz beobachtet (278). Diese wurde auf $^{\cdot}O_2^-$ bzw. auf deren mögliche Folgeprodukte $^{\cdot}OH$ und $^1\Delta_g O_2$ zurückgeführt. Folgende Reaktionsfolge wurde vorgeschlagen, um die toxischen Effekte der angeregten Sauerstoffspezies zu demonstrieren:

$$2O_2 \xrightarrow{\text{Oxidase}} 2\ {}^{\cdot}O_2^- \xrightarrow{2H^+} H_2O_2 + O_2$$

$$^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + O_2$$

$$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{Myeloper-oxidase}} OCl^- + H_2O$$

$$OCl^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2 + H_2O + Cl^-$$

$$\text{Sauerstoff-radikal} + S \longrightarrow S^*$$

$$(\text{z.B. } {}^{\cdot}OH + CO_3^{2-} \longrightarrow OH^- + {}^{\cdot}CO_3^-\ )$$

Dabei ist S ein anregbares Substrat. Da die Akkumulation von PMN-Phagozyten eines der Charakteristika von Inflammationsreaktionen ist, kann somit eine Beteiligung der aktivierten Sauerstoffspezies an Entzündungen vermutet werden.

Die antiinflammatorische Aktivität des "Orgoteins", der für therapeutische Zwecke entwickelten Version der Superoxiddismutase, wird auf die Hemmung dieser Reaktionskaskade zurückgeführt (171,172). In diesem Zusammenhang sind die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen, daß Cu-Komplexe entzündungshemmender Stoffe, die eine höhere antiinflammatorische Aktivität als die Muttersubstanzen aufweisen (174, 175), eine ausgeprägte Superoxiddismutase-Aktivität besitzen, von großer Bedeutung. Sie bestätigen, daß einer der Wirkungsmechanismen antiinflammatorischer Mittel der ist, daß die in vivo gebildeten Cu-Chelate dieser Substanzen die Entstehung der für Entzündungsreaktionen mitverantwortlichen Sauerstoffradikale verhindern. Auf der anderen Seite

waren diese Kupferkomplexe in der Lage, die Prostaglandin-Biosynthese zu hemmen. Es wird vermutet, daß $\cdot O_2^-$-Radikale für die Prostaglandinbildung benötigt werden (169). Die SOD-aktiven Cu-Komplexe könnten ihre Wirkung also auch dadurch zum Ausdruck bringen, daß sie die für die Produktion der Prostaglandine benötigten Sauerstoffradikale abfangen. Da die Prostaglandine als Mediatoren inflammatorischer Reaktionen fungieren, könnte somit die entzündungshemmende Wirkung der untersuchten Cu-Chelate erklärt werden. Sowohl eine direkte Reaktion mit Superoxid und somit ein Verhindern der direkten Schäden durch angeregte Sauerstoffspezies als auch eine indirekte Hemmung des Prostaglandin Synthetase-Komplexes müssen in Betracht gezogen werden. Dabei sollte berücksichtigt werden, daß Acetylsalicylsäure z.B. die Biosynthese der Prostaglandine durch eine direkte Acetylierung des Enzyms hemmt (279). Die Wirkung antiinflammatorischer Mittel sollte daher nicht allein auf die Superoxiddismutase-Aktivität ihrer Cu-Chelate beschränkt werden.

Obwohl wir weit davon entfernt sind, die Natur inflammatorischer Reaktionen zu verstehen, sollte die Rolle aktivierter Sauerstoffspezies sowohl als direkter als auch als indirekter Vermittler beachtet werden. In diesem Zusammenhang gewinnt die Theorie, daß antiinflammatorische Mittel ihre therapeutische Aktivität über ihre in vivo gebildeten Kupferkomplexe, die $\cdot O_2^-$ abfangen, entfalten (174,175,258, 260,267,268) an Bedeutung.

4.3. Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an weiteren enzymatischen Reaktionen

Superoxiddismutase-aktive niedermolekulare Cu-Chelate hemmen mikrosomale Hydroxylierungs- und Dealkylierungsreaktionen sowie die Diaminoxidase-Reaktion. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß Superoxidradikale an diesen Reaktionen beteiligt sein könnten. Hinweise auf die Beteiligung aktivierter Sauerstoffspezies an Cytochrom P-450-abhängigen Reaktionen wurden bereits von Richter et al. geliefert (147-150). Ullrich postulierte die Entstehung von am Porphyrinsystem des Cytochrom P-450 gebundenen Superoxidradikalen während mikrosomaler Hydroxylierungsreaktionen (280). Er schlug ferner vor, daß dieser Komplex leicht dissoziiert, wobei O_2 freigesetzt werden könnte. Die untersuchten SOD-aktiven Cu-Chelate könnten entweder mit freiem oder aber mit porphyringebundenem Superoxid reagieren und so den gesamten Reaktionszyklus mikrosomaler Hydroxylierungen hemmen (Abb. 18).

Bei der Reaktion der Diaminoxidase aus Schweinenieren ist die Bildung von Superoxid nur im zweiten, aeroben Schritt der Katalyse möglich. Hierbei wird die durch die Reaktion mit dem Substrat entstandene Pyridoxaminform des Enzyms in die ursprüngliche Pyridoxalform überführt, wobei NH_3 und H_2O_2 freigesetzt werden. Ein möglicher Mechanismus dieser Reaktionsfolge ist in Abb. 19 vorgeschlagen. Superoxid, das im Laufe der Reaktion produziert wird, bleibt höchstwahrscheinlich am Enzym gebunden (Abb. 19).

Superoxidradikale könnten auch an vielen anderen enzymatischen Reaktionen beteiligt sein. Vor allem bei den Reaktionen von Oxidasen und Oxygenasen wäre eine Beteiligung angeregter Sauerstoffspezies zu erwarten, da der Sauerstoff in seinem Triplett-Grundzustand reaktionsträge ist. Eine solche Beteiligung angeregter Sauerstoffradikale konnte für einige Enzymreaktionen demonstriert werden (152-154).

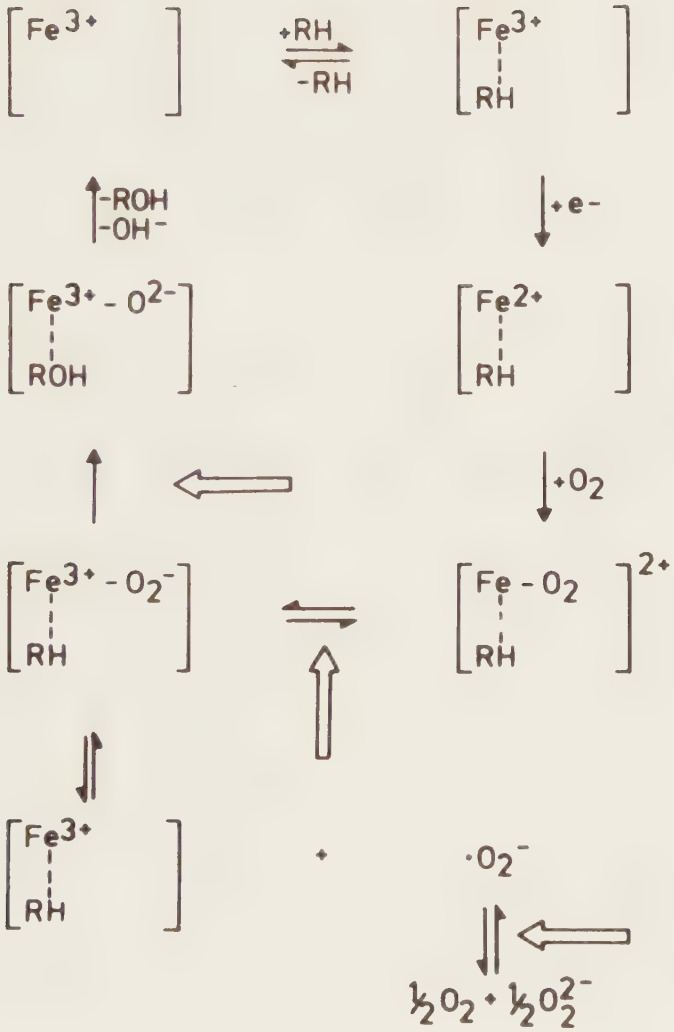
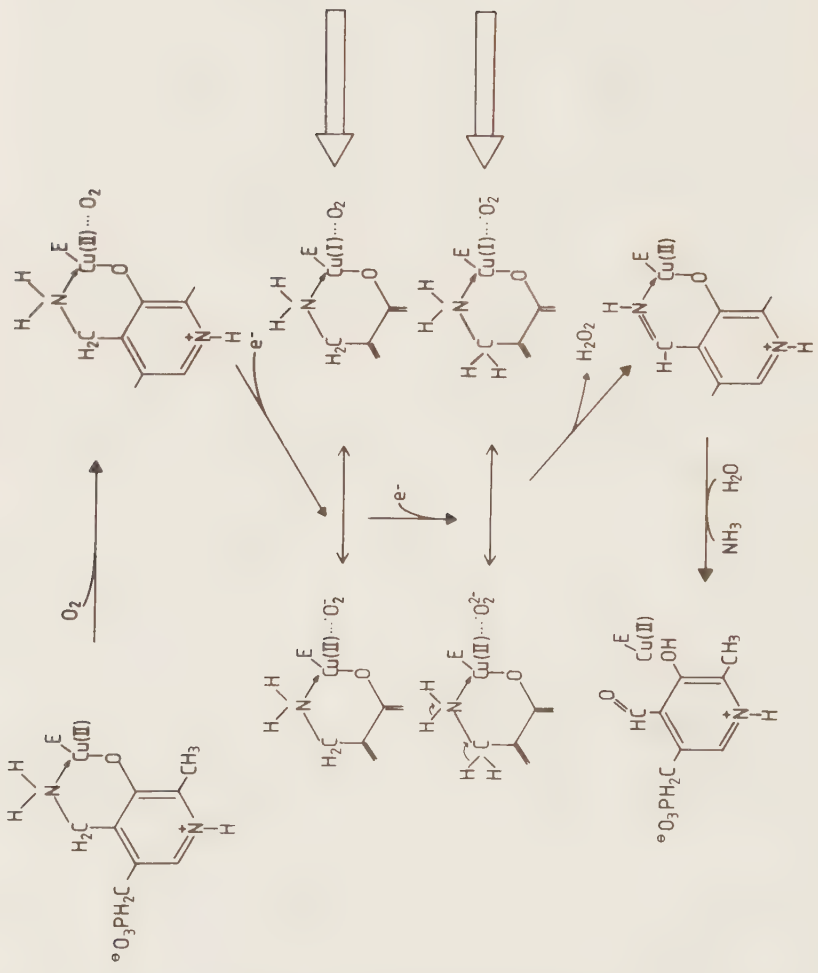


Abb. 18: Mögliche Angriffsstellen für die SOD-aktiven Cu-Chelate während des Reaktionszyklus mikrosomaler Hydroxylierungen wie er von Ullrich vorgeschlagen wurde (280). Diese Angriffspunkte sind durch ⇨ gekennzeichnet.


O2
e-
e-
H2O2
NH3 H2O

Die niedermolekularen SOD-aktiven Cu-Chelate erwiesen sich als gute Indikatoren für die Bildung und die Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an enzymatisch-katalysierten Reaktionen. Sie bieten den Vorteil, daß sie, aufgrund ihrer molekularen Dimensionen, in der Lage sind, auch dort mit Superoxid zu reagieren, wo das Cuprein-Molekül infolge seiner Größe und Polarität und/oder wegen einer Kompartimentierung versagt.

4.4. Energiereiche Sauerstoffspezies in der Biochemie

Energiereiche Sauerstoffspezies scheinen eine zentrale Rolle in der zellulären Biochemie zu spielen. Die toxischen Effekte dieser Radikale beruhen auf einer oxidativen Wirkung. Diese kann jedoch nicht auf Superoxid zurückgeführt werden. Obwohl die Entstehung sekundärer angeregter Sauerstoffspezies, wie $^{\cdot}OH$ und $^1\Delta_gO_2$, die in der Lage wären, oxidativ zu wirken, thermodynamisch (79,81) und unter Annahme einer Metallkatalyse auch kinetisch möglich ist (80), bleiben diese Theorien vorerst ein Gebiet von Spekulationen, da es bis heute noch keine eindeutigen Nachweismethoden für diese Spezies gibt. Superoxid und/oder seine Folgeprodukte spielen u.a. eine Rolle bei der Toxizität hyperbarischen Sauerstoffs (281), bei Strahlenschäden (108-112), bei der Phagozytose (160-165,278) und bei der Lipidperoxidation (9,155-158). Bei der Ozon-Toxizität hingegen scheint Superoxid weder direkt noch indirekt eine Rolle zu spielen (282). Hier, im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen, übt Cuprein keine Schutzfunktion aus. Die Rolle

---

Abb. 19: Vorgeschlagener Mechanismus für den zweiten, aeroben Schritt der Diaminoxidase-Reaktion. Die möglichen Angriffspunkte superoxiddismutativ wirkender Cu-Komplexe sind durch ⟹ gekennzeichnet.

der Superoxiddismutasen bei den Abwehrmechanismen oxidativer Schäden ist noch nicht ganz geklärt. Zum Beispiel bleibt es fraglich, wieso die Superoxiddismutase in Krebsgeweben modifiziert wird (283). Die Substratspezifität und die tatsächliche Funktion der Cupreine im zellulären Geschehen sind momentan Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Jedoch besitzen die angeregten Sauerstoffspezies nicht nur toxische Wirkungen. Viele enzymatische Reaktionen sind ohne vorherige Sauerstoffaktivierung undenkbar. So bleibt noch zu ermitteln, ob Superoxidradikale an der Reaktion der Cytochromoxidase beteiligt sind. Einen Hinweis liefern die identifizierten Zwischenprodukte dieser enzymatischen Katalyse, die auf gebundenes $^{\cdot}O_2^-$ hindeuten (195,196), und die Tatsache, daß Mitochondrien Superoxidradikale produzieren (284). Aber auch die Beteiligung an den biologischen Oxidationsreaktionen muß noch untersucht werden (70). Es steht fest, daß eine Sauerstoffaktivierung für den Organismus unerläßlich ist. Eine Kontrolle wird jedoch benötigt, um die toxischen Wirkungen der so entstandenen Sauerstoffradikale zu verhindern.

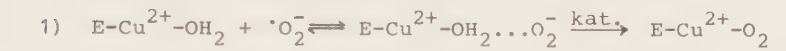
4.5. Die Bedeutung der Struktur-Funktions-Korrelation

Für das Verständnis der Funktion eines biologisch wirksamen Moleküls ist die Kenntnis dessen chemischer Struktur unerläßlich. Ein Mechanismus für eine Reaktion läßt sich erst dann ermitteln, wenn außer den kinetischen und thermodynamischen auch die strukturellen Parameter bekannt sind. Dies wird am Beispiel der 2Cu,2Zn-Superoxiddismutase deutlich. Aus pulsradiolytischen und EPR-Daten konnte ein grober Mechanismus ermittelt werden (123,125):

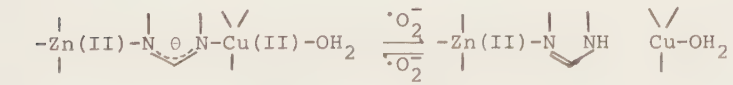
$$E\text{-}Cu^{2+} + {}^{\cdot}O_2^- \longrightarrow E\text{-}Cu^{+} + O_2$$

$$E\text{-}Cu^{+} + {}^{\cdot}O_2^- \xrightarrow{2H^+} E\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

Ein detaillierterer Mechanismus wurde aufgrund indirekter funktioneller und struktureller Untersuchungen entwickelt, bei dem ein "inner sphere" Elektronentransfer stattfinden soll (285):



Erst nach der Ermittlung der genauen Struktur des Enzyms (98,99) konnte ein Mechanismus für die Superoxiddismutation durch Cuprein entwickelt werden, dem die kinetischen und die strukturellen Beobachtungen entsprechen. Das Zn hat eine tetraedrische Umgebung, während das Kupfer planar von vier Histidingruppen umgeben ist. Einer der Histidinliganden (His-61) stellt eine Brücke zwischen beiden Metallionen dar. Diese Imidazolbrücke spielt - wie von McAdam et al. (126) vorgeschlagen - eine bedeutende Rolle in der Katalyse der $\cdot O_2^-$-Disproportionierung. Dies geschieht durch Protonierung und Deprotonierung des Imidazolrests, die gleichzeitig mit der katalytischen Aktion erfolgt:



Bei den blauen Cu-Proteinen sieht es nicht anders aus. Mit Hilfe von indirekten Methoden konnte ermittelt werden, daß Schwefel und Stickstoff zu den Liganden des Kupfers gehören (190-192). Die genaue Struktur ist jedoch erst nach Vollendung der Röntgenstrukturanalyse des Plastocyanins durch

die Arbeitsgruppe von Freeman ermittelt worden (286). Es ergab sich, daß das Kupfer eine sehr verzerrte tetraedrische Koordinationsgeometrie besitzt. Die Koordination erfolgt durch eine Cystein-Thiolgruppe, eine Methionin-Thioäthergruppe und zwei Histidin-Imidazolgruppen. Diese Ergebnisse bestätigen die Rückschlüsse aus indirekten Meßmethoden und erweitern sie dahingehend, daß sowohl eine Thiolat- als auch eine Thioätherkoordination vorliegt.

Bei den redoxaktiven blauen Cu-Proteinen ist jedoch vor allem der Oxidationszustand der beteiligten aktiven Zentren von Bedeutung. Die Koordinationsgeometrie ist weder für Cu(I) (tetraedrisch) noch für Cu(II) (quadratisch-planar) charakteristisch. Die Röntgenphotoelektronenspektrometrie bietet sich an, um die Oxidationsstufe des Kupfers und des Schwefels zu ermitteln. Obwohl die EPR-Hyperfeinstruktur sowohl von Modellkomplexen als auch von den blauen Proteinen selber darauf hindeuten, daß das ungepaarte Elektron in einem Cu(II)-Orbital und nicht in einem Radikal lokalisiert ist (86,87,208,215), so muß bedacht werden, daß die primären Prozesse bei XPS sehr schnell, und zwar innerhalb von 10^{-17} s stattfinden, während die elektronischen Absorptions-, EPR- und chiroptischen Methoden ein Bild des absorbierenden Moleküls innerhalb von 10^{-13} - 10^{-14} s wiedergeben (221,277). Aufgrund der XPS-Daten von Modellchelaten der blauen Kupferproteine, die ergaben, daß der eigentliche Oxidationszustand des Kupfers einer 3 d^{10}-Konfiguration entspricht, kann gefolgert werden, daß bei einem Gleichgewicht

$$RS^{-}Cu(II) \rightleftharpoons RS^{\cdot}CU(I)$$

die rechte Seite stabilisiert wird. Die Lokalisation eines vergleichbaren Gleichgewichts bei den nativen Proteinen kann infolge instrumenteller Einschränkungen noch nicht direkt ermittelt werden. Eine Bestätigung dieser Hypothese liegt in der Tatsache, daß eine kleine Hyperfeinaufspal-

tungskonstante auf einen hohen Grad an Kovalenz schließen läßt, die eine Elektronendelokalisierung zur Folge hat (287). In solch einem Fall kann das Elektron sich hauptsächlich in der Nähe des Kupfers aufhalten. Eine RS·Cu(I)-Struktur würde viele der Redoxeigenschaften blauer Cu-Proteine sowie ihre Reaktionsbereitschaft mit Superoxid erklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Produktanalysen ergaben, daß der beschleunigte Zerfall von $^{\cdot}O_2^-$ in Gegenwart verschiedener Cu-Chelate auf eine echte Katalyse der spontanen Superoxiddismutation und nicht auf eine Reaktion mit dem Radikal in einer Richtung zurückzuführen ist.

Die Spezifität einiger indirekter Bestimmungsmethoden der Superoxiddismutase-Aktivität wurde überprüft. Nitritbildung aus Hydroxylamin, Nitrotetrazoliumblaureduktion, Dihydroxyfumarat-, Adrenalinautoxidation und die Oxidation des letzteren durch Xanthin und Xanthinoxidase erwiesen sich als nicht spezifisch für Superoxid. Abfangreagenzien für $^1\Delta_g O_2$ und $^{\cdot}OH$ hatten keinen Einfluß. H_2O_2 hemmte die Autoxidation des Adrenalins; diese Hemmung wurde bei Zugabe von Katalase aufgehoben.

Aminosäurekomplexe von Fe(III) und Mn(II), das natürlich vorkommende Ferricrocin, sowie einige entzündungshemmende Au-Chelate katalysierten im Gegensatz zu den entsprechenden Cu(II)-Komplexen die Superoxiddismutation nicht.

Die Cu(II)-Chelate von Salicylat, Acetylsalicylat, p-Aminosalicylat und 3,5-Diisopropylsalicylat zeigten eine ausgeprägte Superoxiddismutase-Aktivität während des Cytochrom c-Reduktase-Tests und bei der Reduktion von Nitrotetrazoliumblau durch Xanthin und Xanthinoxidase sowie durch KO_2. Die Konstanten zweiter Ordnung für die Reaktionen von pulsradiolytisch erzeugtem Superoxid mit den Cu-Salicylaten lagen zwischen 0,96 und 2,40 · 10^9 $M^{-1}s^{-1}$. Die antiinflammatorische Wirkung dieser Cu-Chelate kann darauf zurückgeführt werden.

Das entzündungshemmende Cu-D-Penicillamin besaß ebenfalls eine SOD-Aktivität. Die Konstante zweiter Ordnung für dessen Reaktion mit Superoxid lag bei 5,6 · 10^8 $M^{-1}s^{-1}$. ÄDTA

und KCN beeinflußten die Reaktion nicht. Aus XPS-Spektren wurde geschlossen, daß das Kupfer vor und nach der Reaktion mit $^{\cdot}O_2^-$ als 3 d^{10} Cu (Cu(I)) vorliegt. Der am Redoxgeschehen beteiligte Reaktionspartner von Superoxid ist demnach ein durch Cu(I) stabilisiertes Schwefelradikal.

Die Fähigkeit der Cu(II)-Salicylate, in komplexen biologischen Systemen $^{\cdot}O_2^-$ abzufangen, wurde geprüft. Alle Cu-Komplexe verminderten die Dealkylierung von 7-Äthoxycoumarin und die Hydroxylierung von Benzo-[α]-pyren durch induzierte Lebermikrosomen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die antiinflammatorisch aktiven Cu-Salicylate auch im zellulären Geschehen mit Superoxid reagieren.

Cu(II)-Salicylate und Cu-D-Penicillamin erniedrigten die Prostaglandin-Biosynthese. Dieselben Konzentrationen der metallfreien Ligenden blieben ohne Wirkung.

Alle Ergebnisse deuten darauf hin, daß die verstärkte entzündungshemmende Wirkung der Cu-Chelate im Vergleich zu den entsprechenden Liganden auf ihre Superoxiddismutase-Aktivität beruht.

Als Modell für den oxidativen Abbau der Gelenkflüssigkeit bei inflammatorischer Arthritis wurde versucht, den Abbau von Hyaluronsäure durch energiereiche Sauerstoffspezies nachzuweisen. Enzymatisch und chemisch erzeugte $^{\cdot}O_2^-$-Radikale bewirkten keine Zersetzung. Mit Hilfe der Röntgenradiolyse war ersichtlich, daß $^{\cdot}OH$-Radikale, nicht hingegen Superoxid, einen oxidativen Abbau verursachten. Die Reaktion von $^{\cdot}O_2^-$ mit $^{\cdot}OH$ überwog einer möglichen Reaktion mit stöchiometrischem oder überschüssigem H_2O_2. Somit scheint die Bildung von Hydroxylradikalen in vivo aus Superoxid und Peroxid recht unwahrscheinlich. Solche Reaktionen wurden den beobachteten oxidativen Effekten bei inflammatorischer Arthritis zugeschrieben. Die Bildung von $^{\cdot}OH$ und/oder $^1\Delta_g O_2$ aus $^{\cdot}O_2^-$ konnte nicht nachgewiesen werden.

Niedermolekulare, SOD-aktive Cu-Chelate wurden als Indikatoren für die Beteiligung von $^{\cdot}O_2^-$ an der Katalyse von Aminoxidasen eingesetzt. Die Reaktion der Diaminoxidase wurde durch $Cu(Tyr)_2$, $Cu(Lys)_2$ und $CuSO_4$, nicht aber durch $CdCl_2$, gehemmt. Bei der Monoaminoxidase-Reaktion konnte zwar gezeigt werden, daß Superoxid gebildet wird, seine Beteiligung an der enzymatischen Reaktion konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Besonderes Interesse galt dem Plastocyanin und einigen Modellchelaten blauer Cu-Proteine, die möglicherweise Reaktionspartner für $^{\cdot}O_2^-$ im biochemischen Geschehen sind. Das native Cu-Protein aus Petersilie sowie die Modellchelate reagierten mit Superoxid in effektiver Weise. In oxidiertem und reduziertem Plastocyanin konnte aus XPS-Daten trotz ungünstiger Signal-Rausch-Verhältnisse eine unveränderte Oxidationsstufe des Kupfers (Cu $2p_{3/2}$ = 932,1 eV) gemessen werden. Das Cu in den Modellchelaten wurde durchweg als 3 d^{10} Cu ermittelt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß für das aktive Zentrum der blauen Cu-Proteine ein nach rechts verschobenes Gleichgewicht existiert:

$$Cu(II)^{-}SR \rightleftharpoons Cu(I)^{\cdot}SR.$$

Nach oxidativer Zerstörung von $Cu(1\text{-Methyl-2-mercaptoimidazol})_2$ mit H_2O_2, einem typischen Modell des blauen Cu-Chromophors, konnten anhand von XPS-Daten Cu(II) und Schwefel höherer Oxidationsstufen identifiziert werden. Überschüssiges Ascorbat änderte den Oxidationszustand des Kupfers nicht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation" (O. Hayaishi, ed.), Acad. Press, New York, 1974

2. Ochiai, E.-I. (1975), J. Inorg. Nucl. Chem. 37, 1503-1509

3. Haugaard, N. (1968), Physiol. Rev. 48, 311-373

4. Gottleib, S.F. (1971), Ann. Rev. Microbiol. 25, 111-152

5. Bayer, E. und Schretzmann, P. (1967), Structure & Bonding 2, 181-250

6. Samuel, D. in "Biochemie des Sauerstoffs" (B. Hess und Hj. Staudinger, eds.) Springer Verlag, Berlin, 1968, S. 6-25

7. Gilbert, D.L. (1963), Radiat. Res., Suppl. 3, 44-53

8. Schubert, J., Watson, J.A. und White, E.R. (1967), Int. J. Radiat. Biol. 13, 485-489

9. Zimmermann, R., Biochem. Dissertation, Tübingen 1973

10. Cade, P.E., Bader, R.F.W. und Pelletier, J. (1971), J. Chem. Phys. 54, 3517-3533

11. Nilsson, R., Pick, F.M. und Bray, R.C. (1969), Biochim. Biophys. Acta 192, 145-148

12. Känzig, W. und Cohen, M.H. (1959), Phys. Rev. Lett. 3, 509-510

13. Czapski, G. (1971), Ann. Rev. Phys. Chem. 22, 171-208

14. Bielski, B.H.J. und Gebicki, J.M. (1970), Adv. Radiat. Chem. 2, 177-279

15. Fee, J.A. und Hildenbrand, P.G. (1974), FEBS Lett. 39, 79-82

16. Rabani, J. und Nielson, S.O. (1969), J. Phys. Chem. 73, 3736-3744

17. McCord, J.M. und Fridovich, I. (1968), J. Biol. Chem. 243, 5753-5760

18. Azzi, A., Montecucco, C. und Richter, C. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 597-603

19. McCord, J.M. und Fridovich, I. (1969), J. Biol. Chem. 244, 6049-6055

20. Rajagopalan, K.V. und Handler, P. (1964), J. Biol. Chem. 239, 2022-2026

21. Younes, M. und Weser, U. (1976), FEBS Lett. 61, 209-212

22. McCord, J.M. und Fridovich, I. (1969), J. Biol. Chem. 244, 6056-6063

23. Elstner, E.F. und Heupel, A. (1976), Anal. Biochem. 70, 616-620

24. Miller, R.W. und Massey, V. (1965), J. Biol. Chem. 240, 1466-1472

25. Fridovich, I. (1970), J. Biol. Chem. 245, 4053-4057

26. Valentine, J.S. und Curtis, A.B. (1975), J. Am. Chem. Soc. 97, 224-226

27. Bielski, B.H.J. und Saito, E. (1971), J. Phys. Chem. 75, 2263-2266

28. Michelson, A.M. in "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 77-86

29. Michelson, A.M. in "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francixco, 1977, S. 87-106

30. Maricle, D.L. und Hodgson, W.G. (1965), Anal. Chem. 37, 1562-1565

31. Odajima, T. und Yamazuki, I. (1972), Biochim. Biophys. Acta 284, 355-359

32. Forman, H.J. und Fridovich, I. (1972), Science 175, 339

33. Lipitt, B., McCord, J.M. und Fridovich, I. (1972), J. Biol. Chem. 247, 4688-4690

34. Misra, H.P. und Fridovich, I. (1972), J. Biol. Chem. 247, 188-192

35. Heikkila, R.E. und Cohen, G. (1975), Experientia 31, 169-170

36. Klug, D., Rabani, J. und Fridovich, I. (1972), J. Biol. Chem. 247, 4839-4842

37. Cordon, S., Hart, E.J., Matheson, M.S., Rabani, J. und Thomas, J.K. (1963), J. Am. Chem. Soc. 85, 1375-1377

38. Hayon, E. und McGarvey, J.J. (1967), J. Phys. Chem. 71, 1472-1477

39. Fee, J.A. und Valentine, J.S., in: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 19-60

40. Ilan, Y.A., Czapski, G. und Meisel, D. (1976), Biochim. Biophys. Acta 430, 209-224

41. Simic, M.G., Taub, I.A., Tocci, J. und Hurwitz, P.A. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 62, 161-167

42. Rabani, J. (1962), J. Phys. Chem. 66, 361-362

43. Kellogg, E.W. und Fridovich, I. (1975), J. Biol. Chem. 250, 8812-8817

44. Anbar, M. und Neta, P. (1967), Int. J. Appl. Radiat. Isot. 18, 493-523

45. Beauchamp, C. und Fridovich, I. (1970), J. Biol. Chem. 245, 4641-4646

46. Allen, A.O. "The Radiation Chemistry of Water and Aqueous Solutions", Van Nostrand, London, Princeton, N.J., 1960

47. Hochanadel, C.J. (1962), Radiat. Res. 17, 286

48. Merkel, P.B. und Kearns, D.R. (1972), J. Am. Chem. Soc. 94, 7244-7253

49. Merkel, P.B. und Kearns, D.R. (1975), J. Am. Chem. Soc. 97, 462-463

50. Long, C.A. und Kearns, D.R. (1975), J. Am. Chem. Soc. 97, 2018-2020

51. Balny, C., Canva, J., Douzou, P. und Bourdon, J. (1969), Photochem. Photobiol. 10, 375-387

52. Khan, A.U. und Kasha, M. (1966), J. Am. Chem. Soc. 88, 1574-1576

53. Wilson, T. (1969), J. Am. Chem. Soc. 31, 2387-2388

54. Foote, C.S. und Denny, R.W. (1968), J. Am. Chem. Soc. 90, 6233-6235

55. Murray, R.W. und Jindal, S.L. (1972), J. Org. Chem. 37, 3516-3520

56. Murray, R.W. und Kaplan, M.L. (1968), J. Am. Chem. Soc. 90, 537-538

57. Murray, R.W. und Kaplan, M.L. (1968), J. Am. Chem. Soc. 90, 4161-4162

58. Murray, R.W. und Kaplan, M.L. (1969), J. Am. Chem. Soc. 91, 5358-5364

59. Murray, R.W., Lumma, Jr., W.C. und Lin, J.W.-P. (1970), J. Am. Chem. Soc. 92, 3205-3207

60. Khan, A.U. und Kasha, M. (1964), Nature 204, 241-243

61. Khan, A.U. und Kasha, M. (1970), J. Am. Chem. Soc. 92, 3293-3300

62. Foote, C.S. und Wexler, S. (1964), J. Am. Chem. Soc. 86, 3879-3880

63. Foote, C.S. und Wexler, S. (1964), J. Am. Chem. Soc. 86, 3880-3881

64. Foote, C.S. (1968), Accts. Chem. Res. 1, 104-110

65. Kearns, D.R. und Khan, A.U. (1969), Photochem. Photobiol. 10, 193-210

66. Young, R.H., Wherley, K. und Martin, R.L. (1971), J. Am. Chem. Soc. 93, 5774-5779

67. Kautsky, H. (1937), Biochem. Z. 291, 271-284

68. Haber, F. und Weiß, J. (1939), Proc. Roy. Soc. Ser. A 147, 332-351

69. Khan, A.U. (1970), Science 168, 476-477

70. Bors, W., Saran, M., Lengfelder, E., Spöttl, R. und Michel, C. (1974), Current Topics Rad. Res. Quart. 9, 247-309

71. Van Hemmen, J.J. und Meuling, W.J.A. (1975), Biochim. Biophys. Acta 402, 133-141

72. Zimmermann, R., Flohé, L., Weser, U. und Hartmann, H.J. (1973), FEBS Lett. 29, 117-120

73. Lund-Olesen, K. und Menander, K.B. (1974), Therapeut. Res. 16, 706-717

74. Adams, G.E., Dische, S., Fowler, J.F. und Thomlinson, R.H. (1976), The Lancet, 186-188

75. McCord, J.M. (1974), Science 185, 529-531

76. Kellogg, III, E.W. und Fridovich, I. (1975), J. Biol. Chem. 250, 8812-8817

77. Halliwell, B. (1976), FEBS Lett. 72, 8-10

78. Rigo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agrô, A. und Rotilio, G. (1977), FEBS Lett. 80, 130-132

79. Koppenol, W.H. (1976), Nature 262, 420-421

80. McCord, J.M. und Day, Jr., E.D. (1978), FEBS Lett. 86, 139-142

81. Koppenol, W.H. und Butler, J. (1977), FEBS Lett. 83, 1-6

82. Mayeda, E.A. und Bard, A.J. (1974), J. Am. Chem. Soc. 96, 4023-4024

83. Younes, M. (1975), Biochemische Diplomarbeit, Tübingen

84. Guiraud, H.J. und Foote, C.S. (1976), J. Am. Chem. Soc. 98, 1984-1986

85. Weser, U., Schubotz, L.M. und Younes, M. in: "Copper and Environment" (J.O. Nriagu, ed.) Wiley, London, New York, Sydney, Toronto, im Druck

86. Malmström, B.G., Andréasson, L.E. und Reinhammar, B., in: "The Enzymes" (P. Boyer, ed.), Academic Press, New York, London, San Francisco, 1975, S. 507-579

87. Malkin, R. und Malmström, B.G., in: "Advances in Enzymology Vol. 33" (F.F. Nord, ed.), Wiley Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 1970, S. 177-244

88. Rotilio, G., Morpurgo, L., Calabrese, L., Finazzi-Agrô, A. und Mondovi, B., in: "Metal-Ligand Interactions in Organic Chemistry and Biochemistry, part 1" (B. Pullman und N. Goldblum, eds.), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1977, S. 243-253

89. Mann, T. und Keilin, D. (1938), Proc. Roy. Soc. Ser. B 126, 303-315

90. Weser, U. (1973), Structure & Bonding 17, 1-65

91. Fridovich, I. (1972), Accts. Chem. Res. 5, 321-326

92. Fridovich, I., in: "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation" (O. Hayaishi, ed.), Academic Press, New York, 1974, S. 453-477

93. Fridovich, I., in: "Advances in Enzymology Vol. 41" (A. Meister, ed.) Wiley Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 1974, S. 35-97

94. "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977

95. Cass, A.E.G., Hill, H.A.O., Smith, B.E., Bannister, J.V. und Bannister, W.H. (1977), Biochemistry 16, 3061-3066

96. Lippard, S.J., Burger, A.R., Ugurbil, K., Valentine, J.S. und Pantoliano, M.W. (1977), Adv. Chem. Ser. 162, 251-262

97. Rigo, A., Marmocchi, F., Cocco, D., Viglino, P. und Rotilio, G. (1978), Biochemistry 17, 534-537

98. Richardson, J.S., Thomas, K.A. und Richardson, D.C. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 63, 986-992

99. Richardson, D.C. in "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord, I. Fridovich, eds.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 217-223

100. Keele, Jr. B.B., McCord, J.M. und Fridovich, I. (1970), J. Biol. Chem. 245, 6176-6181

101. Yost, Jr. F.J. und Fridovich, I. (1973), J. Biol. Chem. 248, 4905-4908

102. Puget, K. und Michelson, A.M. (1974), Biochimie 56, 1255-1267

103. McCord, J.M., Keele, Jr. B.B. und Fridovich, I. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1024-1027

104. Hewitt, J. und Morris, J.G. (1975), FEBS Lett. 50, 315-318

105. Hatchikian, E.C. und Henry, Y.A. (1977), Biochimie 59, 153-161

106. Gregory, E.M. und Fridovich, I. (1973), J. Bacteriol. 114, 1193-1197

107. Fee, J.A. und Teitelbaum, H.D. (1972), Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 150-158

108. Lavelle, F., Michelson, A.M. und Dimitrijevich, L. (1973), Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 350-357

109. Petkau, A., Chelack, W.S., Pleskach, S.D., Meeker, B.E. und Brady, C.M. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 886-893

110. Petkau, A., Kelly, K., Chelack, W.S., Pleskach, S.D., Barefoot, C. und Meeker, B.E. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 67, 1167-1174

111. Gutteridge, J.M.C. (1977), Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 379-386

112. Petkau, A. und Chelack, W.S. (1976), Biochim. Biophys. Acta 443, 445-456

113. Misra, H.P. und Fridovich, I. (1977), Arch. Biochem. Biophys. 181, 308-312

114. Misra, H.P. und Fridovich, I. (1977), Anal. Biochem. 79, 553-560

115. Rigo, A., Tomat, A. und Rotilio, G. (1974), Electroanal. Chem. Interfac. Electrochem. 57, 291-296

116. Rigo, A., Viglino, P. und Rotilio, G. (1975), Anal. Biochem. 68, 1-8

117. Marklund, S. (1976), J. Biol. Chem. 251, 7504-7507

118. Matheson, M.S. und Dorfman, L.M., "Pulse Radiolysis", MIT Press, Cambridge, 1969

119. Behar, D., Czapski, G., Dorfman, L.M., Rabani, J. und Schwarz, H.A. (1970), J. Phys. Chem. 74, 3209-3212

120. Rabani, J. und Nielsen, S.O. (1969), J. Phys. Chem. 73, 3736-3744

121. Rotilio, G., Bray, R.C. und Fielden, E.M. (1972), Biochim. Biophys. Acta 268, 605-609

122. Klug, D., Rabani, J. und Fridovich, I. (1972), J. Biol. Chem. 247, 4839-4842

123. Klug-Roth, D., Fridovich, I. und Rabani, J. (1973), J. Am. Chem. Soc. 95, 2789-2790

124. Bannister, J.V., Bannister, W.H., Bray, R.C., Fielden, E.M., Roberts, P.B. und Rotilio, G. (1973), FEBS Lett. 32, 303-306

125. Fielden, E.M., Roberts, P.B., Bray, R.C., Lowe, D.J., Mautner, G.N., Rotilio, G. und Calabrese, L. (1974) Biochem. J. 139, 49-60

126. McAdam, M.E., Fielden, E.M., Lavelle, F., Calabrese, L., Cocco, D. und Rotilio, G. (1977), Biochem. J. 167, 271-274

127. Pick, M., Rabani, J., Yost, F. und Fridovich, I. (1974), J. Am. Chem. Soc. 96, 7329-7333

128. Lavelle, F., McAdam, M.E., Fielden, E.M., Roberts, P.B., Puget, K. und Michelson, A.M. (1977), Biochem. J. 161, 3-11

129. Joester, K.-E., Jung, G., Weber, U. und Weser, U. (1972), FEBS Lett. 25, 25-28

130. Joester, K.-E., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1972

131. Brigelius, R., Spöttl, R., Bors, W., Lengfelder, E., Saran, M. und Weser, U. (1974), FEBS Lett. 47, 72-75

132. Brigelius, R., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1974

133. Brigelius, R., Hartmann, H.-J., Bors, W., Saran, M., Lengfelder, E. und Weser, U. (1975), Z. Physiol. Chem. 356, 739-745

134. Levitzki, A., Pecht, I. und Anbar, M. (1965), Nature 207, 1386-1387

135. Sharma, V.S. und Schubert, J. (1969), J. Am. Chem. Soc. 91, 6291-6296

136. Sharma, V.S., Schubert, J., Brooks, H.V. und Sicilio, F. (1970), J. Am. Chem. Soc. 92, 822-826

137. Sigel, H. (1969), Angew. Chem. 81, 161-171

138. Kovács, K. und Matkovic, B. (1975), Enzyme 20, 1-5

139. Lumsden, J. und Hall, D.O. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 595-602

140. Halliwell, B. (1975), FEBS Lett. 56, 34-38

141. Ilan, Y.A. und Czapski, G. (1977), Biochim. Biophys. Acta 498, 386-394

142. Finazzi-Agrò, A., Giovagnoli, C., DeSole, P., Calabrese, L., Rotilio, G. und Mondovi, B. (1972), FEBS Lett. 21, 183-185

143. Weser, U. und Paschen, W. (1972), FEBS Lett. 27, 248-250

144. Paschen, W. und Weser, U. (1973), Biochim. Biophys. Acta 327, 217-222

145. Paschen, W., Biochemische Dissertation, Tübingen 1975

146. Weser, U., Paschen, W. und Younes, M. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 66, 769-777

147. Richter, C., Azzi, A. und Wendel, A. (1976), FEBS Lett. 64, 332-337

148. Richter, C., Azzi, A., Weser, U. und Wendel, A. (1977), J. Biol. Chem. 252, 5061-5066

149. Richter, C., Azzi, A., Weser, U. und Wendel, A., in: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 375-385

150. Richter, C., Biochemische Dissertation, Tübingen 1977

151. Dybing, E., Nelson, S.D., Mitchell, J.R., Sasame, H.A. und Gillette, J.R. (1976), Mol. Pharmacol. 12, 911-920

152. Hirata, F., Ohnishi, T. und Hayaishi, O. (1977), J. Biol. Chem. 252, 4637-4642

153. Ohnishi, T., Hirata, F. und Hayaishi, O. (1977), J. Biol. Chem. 252, 4643-4647

154. Halliwell, B., in: "Superoxide and Superoxide Dismutases " (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 335-349

155. Nakano, M., Nogouchi, T., Sugioka, K., Fukuyama, H. und Sato, M. (1975), J. Biol. Chem. 250, 2404-2406

156. Chan, H.W.-S. (1971), J. Am. Chem. Soc. 93, 2357-2358

157. Pedersen, T.C. und Aust, S.D. (1973), Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 1071-1078

158. Goda, K., Chu, J.-W., Kimura, T. und Schaap, A.P. (1973), Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 1300-1306

159. Krishnamarty, H.G. und Simpson, F.J. (1970), J. Biol. Chem. 245, 1467-1471

160. Allen, R.C., Yevich, S.J., Orth, R.W. und Steele, R.H. (1974), Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 760-767

161. Krinski, N.I. (1974), Science 186, 363-365

162. Babior, B.M., Kipnes, R.S. und Curnutte, J.T. (1973), J. Clin. Invest. 52, 741-744

163. Curnutte, J.T. und Babior, B.M. (1974), J. Clin. Invest. 53, 1662-1672

164. Nakagawara, A. und Minakami, S. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 760-767

165. Salin, M.L. und McCord, J.M., in: "Superoxide and Superoxide Dimutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 257-270

166. Oyanagui, Y. (1977), Biochem. Pharmacol. 26, 473-476

167. Oyanagui, Y. (1977), Agents and Actions 7, 125-132

168. Oyanagui, Y. (1976), Biochem. Pharmacol. 25, 1473-1480

169. Oyanagui, Y. (1976), Biochem. Pharmacol. 25, 1465-1472

170. Carson,S., Vogin, E.E., Huber, W. und Schulte, T.L. (1973), Toxicol. Appl. Pharmacol. 26, 184-202

171. Huber, W. und Saifer, M.G.P., in: "Superoxide and Superoxide Dimutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 517-536

172. Menander-Huber, K.B. und Huber, W., in: "Superoxide and Superoxide Dimutases " (A.M. Michelson, J.M. Mc Cord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 537-549

173. Underwood, E.J. "Trace Elements in Human and Animal Nutrition" 3. Auflage, Academic Press, New York, 1971, S. 51

174. Sorenson, J.R.J. (1976), J. Med. Chem. 19, 135-148

175. Sorenson, J.R.J. (1976), Inflammation 1, 317-331

176. Boyle, E., Freeman, P.C., Gondie, A.C., Mangan, F.R. und Thomson, M. (1976), J. Pharm. Pharmacol. 28, 865-868

177. Rainsford, K.D. und Whitehouse, M.W. (1976), Experientia 32, 1172-1173

178. Rainsford, K.D. und Whitehouse, M.W. (1976), J. Pharm. Pharmac. 28, 83-86

179. Sorenson, J.R.J. (1977), J. Pharm. Pharmac. 29, 450-452

180. Crunkhorn, P. und Willis, A.L. (1971), Brit. J. Pharmacol. 41, 507-512

181. Crunkhorn, P. und Willis, A.L. (1971), Brit. J. Pharmacol. 41, 49-56

182. Willis, A.L. (1976), Pharmacol. Res. Commun. 2, 297-304

183. Kaley, G. und Weiner, R. (1971), Nature New Biol. 234, 114-115

184. Flower, R.J. (1975), Nature 253, 88-90

185. Vane, J.R. (1971), Nature New Biol. 231, 232-235

186. Carminati, P. und Lerner, L.J. (1975), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 455-458

187. Block, H.-U., Taube, Ch. und Förster, W. (1975), Arch. int. Pharmacocyn. 216, 160-164

188. Deby, C., Descampes, M., Binon, F. und Bacg, Z.M. (1975), Biochem. Pharmacol. 24, 1089-1092

189. Pong, S.-S. und Levine, L. (1976), J. Pharmacol. Exp. Therap. 196, 226-230

190. Fee, J.A. (1975), Structure & Bonding 23, 1-60

191. Gray, H.B., Coyle, C.L., Dooley, D.M., Grunthaler, P.J., Hare, J.W., Holwerda, R.A., McCardle, J.V., McMillin, D.R., Rawlings, J., Rosenberg, R.C., Sailasutá, N., Solomon, E.I., Stephans, P.J., Wherland, S. und Wurzbach, J.A. (1977), Adr. Chem. Ser. 162, 145-155

192. Pecht, I., Farver, O. und Goldberg, M. (1977), Adv. Chem. Ser. 162, 179-206

193. Allen, J.F., in: "Superoxide and Superoxide Dimutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 417-436

194. Palmer, G., Babcock, G.T. und Vickery, L.E. (1976), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2206-2210

195. Chance, B., Saronio, C. und Leigh, Jr. J.S. (1975), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1635-1640

196. Chance, B. und Leigh, Jr. J.S. (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 4777-4780

197. Miskowski, V., Tang, S.-P.W., Spiro, T.G., Shapiro, E. und Moss, T.H. (1975), Biochemistry 14, 1244-1250

198. Siiman, O., Young, N.M. und Caray, P.R. (1976), J. Am. Chem. Soc. 98, 744-748

199. Rist, G.H., Hyde, J.S. und Vänngard, T. (1970), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 79-86

200. Holm. R.H. und O'Connor, M.J. (1971), Prog. Inorg. Chem. 14, 241-401

201. Peisach, J. und Mims, W.B. (1978), Eur. J. Biochem. 84, 207-214

202. Solomon, E.J., Hare, J.W. und Gray, H.B. (1976), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 1389-1393

203. Vallee, B.L. und Williams, R.J.P. (1968), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 498-505

204. Jones, T.E., Zimmer, L.L., Diaddario, L.L., Rorabacher, D.B. und Ochrymowycz, L.A. (1975), J. Am. Chem. Soc. 97, 7163-7165

205. Jones, T.E., Rorabacher, D.B. und Ochrymowycz, L.A. (1975), J. Am. Chem. Soc. 97, 7485-7486

206. Miskowski, V.M., Thich, J.A., Solomon, R. und Schugar, H.J. (1976), J. Am. Chem. Soc. 98, 8344-8350

207. Dockal, E.R., Jones, T.E., Sokol, W.F., Engerer, E.J., Rorabacher, D.B. und Ochrymowycz, C.A. (1976), J. Am. Chem. Soc. 98, 4322-4324

208. Sugiura, Y., Hirayama, Y., Tanaka, H. und Ishizu, U. (1975), J. Am. Chem. Soc. 97, 5577-5581

209. Sugiura, Y. (1977), Eur. J. Biochem. 78, 431-435

210. Sugiura, Y. und Hirayama, Y. (1977), J. Am. Chem. Soc. 99, 1581-1585

211. Wright, J.R. und Frieden, E. (1975), Bioinorg. Chem. 4, 163-175

212. Schugar, H.J., Ou, C., Thich, J.A., Potenza, J.A., Lalancette, R.A. und Furey, W.J. (1976), J. Am. Chem. Soc. 98, 3047-3048

213. Bereman, R.D., Wang, F.T., Najdzionek, J. und Braitsch, D.M. (1976), J. Am. Chem. Soc. 98, 7266-7268

214. Dobry-Duclaux, A. und Périchon, P. (1976), J. chim. Phys. 73, 1058-1067

215. Henry, Y. und Dobry-Duclaux, A. (1976), J. Chim. Phys. 73, 1068-1070

216. Thompson, J.S., Marks, T.J. und Ibers, J.A. (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 3114-3118

217. Mössbauer, R.L. (1970), Naturwissenschaften 58, 164-172

218. Rao, K.K., Cammack, R., Hall, D.O. und Johnson, C.E. (1971), Biochem. J. 122, 257-265

219. Cammack, R., Rao, K.K., Hall, D.O. und Johnson, C.E. (1971), Biochem. J. 125, 849-856

220. Nordling, C. (1972), Angew. Chem. 84, 144-153

221. Rupp, H. und Weser, U. (1976), Bioinorg. Chem. 6, 45-59

222. Rupp, H. und Weser, U. (1976), Biochim. Biophys. Acta 446, 151-165

223. Rupp, H. und Weser, U. (1976), Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 223-229

224. Rupp, H., Biochemische Dissertation, Tübingen 1975

225. Hartmann, H.-J. und Weser, U. (1977), Biochim. Biophys. Acta 491, 211-222

226. Weser, U., Hartmann, H.-J., Fretzdorff, A. und Strobel, G.-J. (1977), Biochim. Biophys. Acta 493, 465-477

227. Weser, U., Sokolowski, G. und Pilz, W. (1977), J. Elec. Spectr. 10, 429-439

228. Solomon, E.I., Clendering, P.J., Gray, H.B. und Grunthaner, F.J. (1975), J. Am. Chem. Soc. 97, 3878-3879

229. Wurzbach, J.A., Grunthaner, P.J., Dooley, D.M., Gray, H.B., Grunthaner, F.J., Gay, R.R. und Solomon, E.I. (1977), J. Am. Chem. Soc. 99, 1257-1258

230. Peeling, J., Haslett, B.G., Evans, I.M., Clark, D.T. und Boulter, D. (1977), J. Am. Chem. Soc. 99, 1025-1028

231. Weser, U., Bunnenberg, E., Cammack, R., Djerassi, C.D., Flohé, L., Thomas, G. und Voelter, W. (1971), Biochim. Biophys. Acta 243, 203-213

232. Graziani, M.T., Finazzi-Agrò, A., Rotilio, G., Barra, D. und Mondovi, B. (1974), Biochemistry 13, 804-809

233. Massey, V., Brumby, P.E., Komai, H. und Palmer, G. (1969), J. Biol. Chem. 244, 1682-1691

234. Remmer, H., Greim, H., Schenkmann, J.B. und Estabrook, R.W. (1967), Methods Enzymol. X, 703-708

235. deAlvare, L.R., Goda, K. und Kimura, T. (1976), Biochem. Biophys. Res. Comm. 69, 687-694

236. Brown, B.W. und Lingafelter, E.C. (1964), Acta Crys. 17, 254-259

237. Tucker, W.F., Asplund, R.O. und Holt, S.L. (1975), Arch. Biochem. Biophys. 166, 433-438

238. Schöniger, W. (1961), Z. Analyt. Chem. 181, 28-39

239. Misra, H.P. und Fridovich, I. (1972), J. Biol. Chem. 247, 3170-3175

240. Paschen, W., Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1972

241. Weser, U. und Voelcker, G. (1972), FEBS Lett. 22, 15-22

242. Goldberg, B. und Stern, A. (1977), Arch. Biochem. Biophys. 178, 218-225

243. Fielden, E.M. und Holm, N.W., in: "Manual on Radiation Dosimetry" (N.W. Holm und R.J. Berry, eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, 1970

244. Sehested, K., in: "Manual on Radiation Dosimetry" (N.W. Holm und R.J. Berry, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1970, S. 313-317

245. Ullrich, V. und Weber, P. (1972), Z. Physiol. Chem. 353, 1171-1177

246. de Pierre, J.W., Moron, M.S., Johannesen, K.A.M. und Ernster, L. (1975), Anal. Biochem. 63, 470-484

247. White, H.L. und Glassman, A.T. (1974), Prostaglandins 7, 123-129

248. Tabor, C.W., Tabor, H. und Rosenthal, S.M. (1954), J. Biol. Chem. 208, 645-661

249. Buffoni, F. und Blaschko, H. (1964), Proc. Roy Soc. B161, 153

250. Holmstedt, B., Larsson, L. und Tham, R. (1961), Biochim. Biophys. Acta 48, 182-186

251. Massey, V., in: "Flavins and Flavoproteins" (H. Kamin, ed.) University Park Press, Butterworths, London, Boston, 1971, S. 349-361

252. Amano, D., Kagosaki, Y., Usui, T., Yamamoto, S. und Hayaishi, O. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm. 66, 272-279

253. Bors, W., Saran, M., Michel, C., Lengfelder, E., Fuchs, C. und Spöttl, R. (1975), Int. J. Radiat. Biol. 28, 353-371

254. Younes, M. und Weser, U. (1976), FEBS Lett. 71, 87-90

255. Rapp. U., Adams, W.C. und Miller, R.W. (1973), Can. J. Biochem. 51, 158-171

256. Schubotz, L.M. und Weser, U. (1978), Bioinorg. Chem., im Druck

257. Bors, W., Michel, C., Saran, M. und Lengfelder, E. (1978), Biochim. Biophys. Acta 540,162-172

258. Weser, U., Richter, C., Wendel, A. und Younes, M. (1978), Bioinorg. Chem. 8, 201-213

259. Weitzel, G. und Schaeg, W., in: "Biochemisches Taschenbuch" (H.M. Raven, ed.) Vol. 11, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, 1964, S. 150-159

260. Younes, M., Lengfelder, E., Zienau, S. und Weser, U. (1978), Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 576-580

261. Walshe, M., in: "The Biochemistry of Copper" (J. Peisach, P. Aisen und W.E. Blumberg, eds.), Academic Press, New York, 1966, S. 475-498

262. Sugiura, Y. und Tanaka, H. (1972), Mol. Pharmacol.8, 249-255

263. Birker, P.J.M.W.L. und Freeman, H.C. (1976), J. Chem. Soc. Chem. Comm. 72, 223-229

264. Birker, P.J.M.W.L. und Freeman, H.C. (1977), J. Am. Chem. Soc. 99, 6890-6899

265. Graf, L. und Fallab, S. (1964), Experientia 20, 46-47

266. Peisach, J. und Blumberg, W.E. (1969), Mol. Pharmacol. 5, 200-209

267. Younes, M. und Weser, U. (1977), Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 1247-1253

268. Lengfelder, E., Richter, C., Younes, M. und Weser, U. (1978), Eur. J. Biochem., zur Veröffentlichung eingereicht

269. Sadler, P.J. (1976), Structure & Bonding 29, 171-219

270. McCord,J.M. und Day, Jr., E.D. (1978), FEBS Lett. 86, 139-142

271. Dorfman, A., in: "Methods in Enzymology" (S.D. Colowick und N.O. Kaplan, eds.), Band I, Academic Press, New York, 1955, S. 166-173

272. Reissig, J.L., Strominger, J.L. und Leloir, L.F. (1955), J. Biol. Chem. 217, 959-966

273. Rotilio, G., Calabrese, L., Finazzi-Agrò, A. und Mondovi, B. (1970), Biochim. Biophys. Acta 198, 618-620

274. Younes, M. und Weser, U. (1978), Biochim. Biophys. Acta, zur Veröffentlichung eingereicht

275. Finazzi-Agrò, A., Rotilio, G., Costa, M.T. und Mondovi, B. (1969), FEBS Lett. 4, 31-32

276. Younes, M., Pilz, W. und Weser, U. (1978), Bioinorg. Chem., im Druck

277. Jørgensen, C.K., in: "Advances in Quantum Chemistry", Vol 8, Academic Press, New York, 1974, S. 137-182

278. Johnston, R.B. und Lehmeyer, J.E. in: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 291-305

279. Roth, G.J., Stanford, N. und Majerus, P.W. (1975), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3073-3076

280. Ullrich, V. (1972), Angew. Chem. Int. Ed. 11, 701-712

281. Crapo. J.D., in: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 231-238

282. Douglas, J.S., Curry, G. und Geffkin, S.A. (1977), Life Sci. 20, 1187-1192

283. Petkau, A., Monasterski, L.G., Kelly, K. und Friesen, H.G. (1977), Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 17, 125-132

284. Flohé, L., Loschen, G., Azzi, A. und Richter, C., in: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 323-334

285. Fee, J.A., in: "Superoxide and Superoxide Dismutases" (A.M. Michelson, J.M. McCord und I. Fridovich, eds.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977, S. 173-192

286. Colman, P.M., Freeman, H.C., Guss, J.M., Murata, M., Norris, V.A., Ramshaw, J.A.M. und Venkatappa, M.P. (1978), Nature 272, 319-324

287. Knowles, P.F. (1972), Essays in Biochem. 8, 79-106

Lebenslauf

Am 4.5.1950 wurde ich als drittes Kind des späteren Präsidenten des ägyptischen Fernsehens, Abdel Hamid Younes, und seiner Frau Doria Nosseir, damals Gymnasiallehrerin, in Kairo, Ägypten, geboren.
Von 1956 bis 1969 besuchte ich die Deutsche Evangelische Oberschule in Kairo. Dort bestand ich 1969 die deutsche Reifeprüfung (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig).
Im Herbst 1969 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Studienfach Chemie und studierte von Frühjahr 1970 an Biochemie an der gleichen Universität. Im März 1971 bestand ich den ersten Teil, im April 1972 den zweiten Teil der Diplomvorprüfung. Im Juli 1974 legte ich den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung ab und fertigte anschließend eine Diplomarbeit über das Thema "Zur Substratspezifität der Superoxiddismutase (Cuprein)" unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Weser, Tübingen, an.
Von November 1975 bis Mai 1978 arbeitete ich an meiner Dissertation "Cu(I), Cu(II) und RS$^{\bullet}$ in der Biochemie des Sauerstoffs" unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Weser am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten: Bayer, Gönnenwein, Grell, Harder, Krüger, Mauser, Metzner, Mörike, E. Müller, Remmer, Rüdorff, Schweizer, Seelig, Seyffert, Voelter, Wegmann, Weitzel, Wendel, Weser und Zähner.